

**IMPACTS DES BOUES D'ÉPURATION SUR LA MICROFLORE DES SOLS,  
DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE DÉTECTION MICROBIENNE POUR  
DES ÉCHANTILLONS DE SOL ET DIFFÉRENCIATION DES ESPÈCES  
*STREPTOMYCES CAVISCABIES* ET *STREPTOMYCES SCABIES***

par

Marc St-Martin

mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, août 1997



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-35708-2



Le 5 janvier 1998, le jury suivant a accepté ce mémoire, dans sa version finale.

Président-rapporteur:	M. Ryszard Brzezinski Département de biologie	_____
Membre:	Mme Carole Beaulieu Département de biologie	_____
Membre:	M. Claude Déry Département de biologie	_____

## SOMMAIRE

La fertilisation des sols avec des boues résiduaires est une solution de plus en plus envisagée comme mode de gestion de ce résidu. Toutefois, les différents composés que l'on retrouve dans les boues pourraient perturber de façon considérable la microflore du sol et l'ensemble de cet écosystème. La majeure partie de ces travaux visait donc à évaluer les impacts que peut représenter une valorisation agricole de boues résiduaires sur la microflore du sol ainsi qu'à développer une méthode de détection microbienne valable, aussi bien pour des sols non amendés que pour des sols fertilisés avec des boues d'épuration. L'autre partie des travaux consistait à différencier des souches appartenant aux espèces *S. scabies* et *S. caviscabies*, deux des principaux agents causals de la gale commune de la pomme de terre.

Pour l'évaluation des impacts causés par des épandages de boues résiduaires, trois populations bactériennes furent étudiées. La première d'entre elles est la population de bactéries totales, dont les décomptes ont été effectués sur le milieu «Nutrient Agar» (NA) à partir d'échantillons de sols amendés différemment et à petite échelle en laboratoire. Ces décomptes bactériens ont démontré que, lorsque des valorisations équivalentes à la dose québécoise de fertilisation maximale étaient effectuées, cela entraînait une augmentation significative et considérable du nombre de bactéries dans le sol. De plus, dans ces cas, un délai supérieur à six mois était requis pour que la concentration bactérienne redevienne la même que celle d'un sol n'ayant pas reçu de boues. En second lieu, nous avons dénombré les populations de bactéries résistantes à certains métaux lourds. Ces dénombrements ont été réalisés grâce à sept milieux sélectifs confectionnés à partir de NA supplémenté avec un sel de métal lourd, sur des échantillons de cinq terres agricoles fertilisées à différents temps sur une période de cinq ans. Les résultats ont permis de constater que les valorisations à l'étude n'ont provoqué aucune augmentation des populations bactériennes du sol résistantes au cadmium, au cobalt, au cuivre, au molybdène, au nickel, au sélénium et au zinc. Ce sont les coliformes qui représentaient la troisième population bactérienne étudiée pour

cette évaluation des impacts des boues d'épuration sur la microflore des sols. Ce suivi a mené à la conclusion qu'une valorisation pourrait représenter des risques pour la contamination des sols et pour la santé humaine, puisque des coliformes étaient toujours présents en concentration supérieure à 500 cellules/gramme de sol, dans des terreaux amendés à petite échelle en laboratoire. Ces terreaux avaient reçu la quantité de boues maximale permise par les normes québécoises et ce, même six mois après que les amendements aient été effectués. Ces données ont pu être recueillies à l'aide de la méthode de détection microbienne mise au point dans ces travaux. En effet, les amorces UAL-754 et UAR-900 ont permis de démontrer que la méthode développée ici peut détecter des microorganismes d'une façon simple, rapide et reproductible, lorsque l'ADN cible leur étant spécifique est présente en concentration supérieure ou égale à 500 séquences par gramme de sol. Cette méthode, permettant l'analyse de plusieurs échantillons à la fois, se révèle donc suffisamment efficace et sensible pour servir d'outil de détection microbienne dans des échantillons environnementaux comme les sols, qu'ils soient amendés ou non avec des boues résiduelles. La méthode de détection comprend une extraction et une purification de l'ADN des microorganismes du sol, suivies d'une amplification par «Polymerase Chain Reaction» (PCR) des séquences d'ADN spécifiques présentes dans l'échantillon. Les deux protocoles d'extraction suggérés sont ceux qui se sont montrés les plus efficaces parmi les cinq techniques étudiées, soit le protocole de Tsai et Olson (1991) et celui de Trevors *et al.* (1992). Le processus de purification qui a permis de rendre les extraits d'ADN provenant de sols amendés par des boues résiduelles suffisamment exempts de substances contaminantes pour mener à des détections sensibles et fiables, est la combinaison phénol/chloroforme, Sephadex G-200 ainsi que Chelex-100. Dans le cas des échantillons provenant de sols n'ayant pas reçu de boues, la purification sur Chelex-100 n'est toutefois pas nécessaire.

Finalement, la dernière partie de ces travaux, qui portait sur la détection et la différenciation d'espèces de *Streptomyces*, a confirmé que les souches de *S. caviscabies* forment un groupe taxonomique homologue et génétiquement différent de *S. scabies*. Il a également pu être

démontré que la PCR et la paire d'amorces MSTM constituent un outil taxonomique simple, rapide et efficace pouvant distinguer les souches de ces deux espèces bactériennes. Toutefois, les résultats ont aussi permis de constater que les deux paires d'amorces pA/pH\* et MSTM-1L/MSTM-2C n'étaient pas suffisamment spécifiques pour effectuer des détections fiables de bactéries du genre *Streptomyces* dans des échantillons de sol.

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement ma directrice de recherche, le docteur Carole Beaulieu, pour sa disponibilité, sa confiance, ses judicieux conseils et le fait qu'elle m'a toujours laissé une liberté de décision dans ce projet de recherche ainsi que dans le reste de mes faits et gestes, ce qui a contribué à rendre ces travaux de maîtrise enrichissants et agréables. Je désire également souligner la patience dont elle a su faire preuve, surtout pendant mon long processus de rédaction. Je voudrais aussi remercier mes conseillers, les docteurs Ryszard Brzezinski et Claude Déry pour leur collaboration et leurs conseils.

J'adresse également mes remerciements à Claudia Goyer, qui m'a fourni l'ADN des souches de *Streptomyces*, à Chantal Bouchard, qui m'a aidé lors de l'échantillonnage des sols, ainsi qu'à Alexandre Lefebvre et Caroline Cloutier pour les considérables services qu'ils m'ont rendus. Merci aussi à Dario Lehoux et Carole Boulanger, pour leurs conseils, à Maxime Douziech et François Robert, pour leur contribution «informatique» à ma rédaction, ainsi qu'à tous mes compagnons et collègues de travail pour leur aide. Ils ont formé un auditoire chaleureux et sympathique lors de mes «racontages» et prestations diverses. Ce furent d'agréables moments.

Je désire aussi mentionner ma gratitude envers l'organisme qui a subventionné ce projet de recherche, le Groupe STOPER, qui fait partie du Programme Éco-recherche, financé par le Plan Vert d'Environnement Canada et administré par le secrétariat Inter-conseils (C.R.S.N.G, C.R.M. et C.R.S.H.).

Enfin, je remercie spécialement ceux qui m'ont toujours aimé, supporté et qui sont encore là quand j'ai besoin d'eux, mes parents Paul et Nicole. Merci de m'avoir donné le goût d'apprendre, la possibilité d'étudier et les nombreux encouragements qui me motivent dans tout ce que j'entreprends.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	ii
REMERCIEMENTS.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xvi
LISTE DES FIGURES.....	xvii
INTRODUCTION.....	1
Le sol et son écosystème microbien.....	1
Les caractéristiques du sol.....	1
La microflore du sol.....	2
Les interactions microbiennes.....	5
Les rôles et les fonctions des microorganismes du sol.....	5
La diversité et la stabilité de la communauté microbienne du sol.....	7
Les boues résiduelles provenant du traitement des eaux usées.....	9
La situation du traitement des eaux au Québec.....	9
La composition des boues d'épuration.....	9
Les modes de gestion des boues d'épuration.....	11
La valorisation des boues d'épuration : les avantages et les inconvénients.....	12
Les méthodes de suivi et de détection de populations microbiennes dans les sols.....	14
La «Polymerase Chain Reaction» (PCR).....	17
L'amplification à l'aide de la PCR.....	17
Les applications de la PCR.....	19
L'obtention d'ADN microbien provenant d'échantillons environnementaux.....	21
La première étape pour l'obtention d'ADN microbien : l'extraction del'ADN.....	22

La deuxième étape pour l'obtention d'ADN microbien : la purification del'extrait d'ADN.....	22
La situation et les objectifs de la recherche.....	23
 CHAPITRE 1 - MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	26
1.1 Les dénombrements de la population bactérienne de sols ayant subi divers amendements par des boues résiduares (méthodologie du volet 1).....	26
1.1.1 Le sol utilisé pour les décomptes bactériens.....	26
1.1.2 L'amendement des sols et les boues utilisées.....	26
1.1.3 Le suivi et la méthode d'échantillonnage des sols amendés.....	27
1.1.4 Le traitement des échantillons de sol pour les décomptes bactériens et le milieu de culture utilisé.....	28
1.2 Les dénombrements des populations bactériennes résistantes aux métaux lourds dans les sols fertilisés avec des boues résiduares (méthodologie du volet 2).....	28
1.2.1 Les sites d'échantillonnage.....	29
1.2.2 L'échantillonnage des sols.....	29
1.2.3 Les métaux lourds étudiés et les milieux de culture utilisés.....	31
1.2.4 Le traitement des échantillons de sol pour les décomptes bactériens.....	32
1.3 Le développement d'une technique efficace de détection microbienne pour des sols ayant reçu un épandage de boues résiduares, la vérification de la présence possible de coliformes dans des sols amendés par des boues et la différenciation de certaines espèces bactériennes du genre <i>Streptomyces</i> (méthodologie du volet 3).....	32
1.3.1 Le sol ayant servi aux extractions d'ADN microbien.....	33
1.3.2 L'inoculation des bactéries agissant comme cellules cibles.....	33
1.3.3 Les protocoles d'extraction d'ADN des microorganismes du sol.....	34

1.3.3.1	Le protocole d'extraction d'ADN indirecte de Steffan et Atlas(1988).....	34
1.3.3.2	Le protocole d'extraction d'ADN directe de Bruce <i>et al.</i> (1992).....	34
1.3.3.3	Le protocole d'extraction d'ADN directe de Tsai et Olson (1991).....	35
1.3.3.4	Le protocole d'extraction d'ADN directe de Trevors <i>et al.</i> (1992).....	35
1.3.3.5	Le protocole d'extraction d'ADN directe de Volossiouk et al.(1995).....	36
1.3.4	La visualisation et la quantification de l'ADN extrait des microorganismesdusol.....	36
1.3.5	L'obtention de l'ADN génomique des bactéries du genre <i>Streptomyces</i> .....	37
1.3.6	La purification des extraits bruts d'ADN isolés des microorganismes dusol.....	37
1.3.6.1	La purification par solvants organiques.....	38
1.3.6.2	Les purifications par chromatographies.....	38
1.3.6.2.1	La purification sur colonne de Sephadex G-200.....	38
1.3.6.2.2	La purification sur colonne de Chelex-100.....	39
1.3.7	Les détections et les différenciations de microorganismes par la PCR.....	40
1.3.7.1	Les amorces utilisées pour les réactions de PCR.....	40
1.3.7.2	Les réactions d'amplification par PCR.....	42
1.3.7.2.1	L'amplification à l'aide des amorces UAL-754 et UAR-900(détectiond' <i>E.coli</i> ).....	42
1.3.7.2.2	L'amplification à l'aide des amorces pA et pH* (détectionde <i>Streptomyces</i> sp.).....	43



1.3.7.2.3 L'amplification à l'aide des amorces MSTM-1L et MSTM-C2 (détection de <i>Streptomyces</i> sp.).....	44
1.3.7.3 La détection et la visualisation de l'ADN amplifié par PCR.....	45
CHAPITRE 2 - RÉSULTATS.....	46
2.1 Les dénombrements de la population bactérienne des sols ayant subi divers amendements par des boues résiduaires (description des résultats du volet 1).....	46
2.2 Les dénombrements des populations bactériennes résistantes aux métaux lourds dans les sols fertilisés avec des boues résiduaires (description des résultats du volet2).....	48
2.2.1 La description comparative entre les dénombrements de bactéries résistantes à chacun des métaux lourds des parcelles fertilisées et des parcelles témoins de chaque site d'étude.....	49
2.2.2 La description comparative entre les dénombrements des bactéries résistantes au même métal lourd dans le sol des cinq sites d'étude.....	55
2.3 Le développement d'une technique efficace de détection microbienne pour des sols ayant reçu un épandage de boues résiduaires, la vérification de la présence possible de coliformes dans des sols amendés et la différenciation de certaines espèces bactériennes du genre <i>Streptomyces</i> (description des résultats du volet 3)...	57
2.3.1 Résultats obtenus des cinq protocoles d'extraction de l'ADN des microorganismes du sol expérimentés.....	57
2.3.2 Résultats obtenus des trois méthodes utilisées pour purifier les extraits bruts d'ADN isolés des microorganismes du sol.....	60
2.3.3 Résultats de détections et de différenciations de microorganismes par la PCR.....	61

2.3.3.1 Résultats concernant la détermination du seuil minimal de détection et la validité de la technique de détection microbiennedéveloppée.....	61
2.3.3.2 Résultats concernant la vérification de la présence possible de coliformes dans les sols amendés par des boues résiduaires...	67
2.3.3.3 Résultats concernant la détection et la différenciation de certaines bactéries du genre <i>Streptomyces</i> .....	68
CHAPITRE 3 - DISCUSSION.....	77
3.1 Les dénombrements de la population bactérienne des sols ayant subi divers amendements par des boues résiduaires (discussion et analyse des résultats du volet 1).....	77
3.2 Les dénombrements des populations bactériennes résistantes aux métaux lourds dans les sols fertilisés avec des boues résiduaires (discussion et analyse des résultats du volet 2).....	82
3.2.1 La comparaison entre les dénombrements de bactéries résistantes à chacun des métaux lourds des parcelles fertilisées et des parcelles témoins de chaque site d'étude.....	83
3.2.2 La comparaison entre les dénombrements des bactéries résistantes au même métal lourd dans le sol des cinq sites d'étude.....	90
3.3 Le développement d'une technique efficace de détection microbienne pour des sols ayant reçu un épandage de boues résiduaires, la vérification de la présence possible de coliformes dans des sols amendés et la différenciation de certaines espèces bactériennes du genre <i>Streptomyces</i> (discussion et analyse des résultats du volet 3).....	93

3.3.1 La comparaison des cinq protocoles d'exaction de l'ADN des microorganismes du sol expérimentés et la détermination de la technique la plus adéquate aux détections microbiennes par PCR.....	93
3.3.2 Les contaminants des extraits bruts d'ADN isolés des microorganismes du sol et l'analyse des résultats obtenus des trois méthodes utilisées pour leur purification.....	99
3.3.3 Les détections et les différenciations de microorganismes par la PCR.....	103
3.3.3.1 L'analyse de l'efficacité des méthodes de purification utilisées, la détermination du seuil minimal de détection et la validité de la technique de détection microbienne développée.....	103
3.3.3.2 La vérification de la présence possible de coliformes dans les sols amendés par des boues résiduares.....	109
3.3.3.3 Les détections et la différenciation de certaines bactéries du genre <i>Streptomyces</i> .....	114
CONCLUSION.....	121
ANNEXES.....	124
Annexe A - Bulletins d'analyse des boues résiduares.....	125
Annexe B - Bulletins d'analyse de la teneur des sols en certains métaux lourds disponibles.....	134
BIBLIOGRAPHIE.....	137

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

### Unités de mesure

°C :	degré Celsius
cm :	centimètre
g :	gramme
g :	unité de force gravitationnelle
ha :	hectare
hre(s) :	heure (s)
Kb :	kilobase (1000 bases)
Kg :	kilogramme
l :	litre
m :	mètre
m <sup>2</sup> :	mètre carré
M :	molaire
mg :	milligramme
min :	minute
ml :	millilitre
mM :	millimolaire
m.s. :	matières solides
N disp. :	azote disponible
ng :	nanogramme
nm :	nanomètre
pb :	paire de bases
pg :	picogramme
pmol :	picomole

p/v :	rapport poids/volume
sec. :	seconde
U :	unité enzymatique
ufc :	unité formatrice de colonie
v/v :	rapport volume/volume
v/v/v :	rapport volume/volume/volume
µg :	microgramme
µl :	microlitre
µm :	micromole
µM :	micromolaire
% :	pourcentage

### **Composés chimiques, tampons et milieux**

ADN :	acide désoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNr :	ARN ribosomal
ATP :	adénosine triphosphate
BPC :	biphényle polychloré
CsCl :	chlorure de césium
DMSO :	diméthyle sulfoxide
DNase :	désoxyribonucléase
dNTPs :	désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
HAP :	hydrocarbure aromatique polycyclique
HCl :	acide chlorhydrique

KCl :	chlorure de potassium
LB :	milieu Luria-Bertani
NA :	milieu «Nutrient Agar»
NB :	milieu «Nutrient Broth»
PC :	pentachlorophénol
PEG :	polyéthylène glycol
PVPP :	polyvinylpolypyrrolidone
RNAse :	ribonucléase
SDS :	dodécyl sulfate de sodium
TAE :	tris:acétate:EDTA (tampon)
TBE :	tris:borate:EDTA (tampon)
TE :	tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0 (tampon)
Tris :	tris(hydroxyméthyl)aminométhane

## **Métaux lourds**

Al :	aluminium
Cd :	cadmium
Co :	cobalt
Cr :	chrome
Cu :	cuivre
Hg :	mercure
Mo :	molybdène
Ni :	nickel
Pb :	plomb
Se :	sélénium
Zn :	zinc

## Divers

D.O. : densité optique

ELISA : «Enzyme-Linked Immunosorbent Assay»

MENVIQ : Ministère de l'environnement du Québec

MPN : nombre le plus probable («Most Probable Number»)

m.s. : matières solides

PCR : réaction de polymérisation en chaîne («Polymerase Chain Reaction»)

pH : potentiel hydrogène

rpm : révolution par minute

sp. : espèce

STOPER: Projet de STRatégies d'OPTimisation d'Écosystèmes Régionaux de  
l'Université de Sherbrooke

## LISTE DES TABLEAUX

1. Nombres relatifs et biomasses approximatives d'organismes de la microflore et de la microfaune d'un sol fertile.....3
2. Proportions relatives des genres bactériens aérobies et anaérobies facultatifs couramment retrouvés dans le sol.....4
3. Doses de boues résiduares valorisées à petite échelle sur les échantillons de sol en pot.....27
4. Sites d'échantillonnage sélectionnés pour les décomptes des bactéries du sol résistantes aux métaux lourds.....30



## LISTE DES FIGURES

1. Illustration de la Polymerase Chain Reaction (PCR) pour l'amplification spécifique d'une séquence d'ADN cible.....	18
2. Dénombrements de la population bactérienne totale des sols sur une période de 190 jours suivant divers amendements de boues résiduares.....	47
3. Dénombrements des bactéries du sol résistantes à sept métaux lourds dans la parcelle fertilisée et la parcelle témoin d'une terre agricole cinq ans après son amendement par des boues résiduares (site Lac Mégantic A, fertilisé en 1989).....	50
4. Dénombrements des bactéries du sol résistantes à sept métaux lourds dans la parcelle fertilisée et la parcelle témoin d'une terre agricole trois ans après son amendement par des boues résiduares (site Lac Mégantic B, fertilisé en 1990 et en 1991).....	51
5. Dénombrements des bactéries du sol résistantes à sept métaux lourds dans la parcelle fertilisée et la parcelle témoin d'une terre agricole deux ans après son amendement par des boues résiduares (site Lac Mégantic C, fertilisé en 1992).....	52
6. Dénombrements des bactéries du sol résistantes à sept métaux lourds dans la parcelle fertilisée et la parcelle témoin d'une terre agricole un an après son amendement par des boues résiduares (site Princeville A, fertilisé en 1993).....	53
7. Dénombrements des bactéries du sol résistantes à sept métaux lourds dans la parcelle fertilisée et la parcelle témoin d'une terre agricole un mois après son amendement par des boues résiduares (site Princeville B, fertilisé en 1993 et en 1994).....	54

8. Électrophorèse des extraits d'ADN des microorganismes du sol obtenus par cinq différents protocoles.....	58
9. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces UAL-754 et UAR-900 sur des extraits d'ADN microbien, non purifiés par Chelex-100, qui provenaient d'un sol non amendé par des boues résiduelles et inoculé par des cellules cibles.....	63
10. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces UAL-754 et UAR-900 sur des extraits d'ADN microbien, purifiés par Chelex-100, qui provenaient d'un sol non amendé par des boues résiduelles et inoculé par des cellules cibles.....	64
11. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces UAL-754 et UAR-900 sur des extraits d'ADN microbien, non purifiés sur colonne de Chelex-100, qui provenaient de sols différemment amendés par des boues résiduelles et inoculés par des cellules cibles.....	65
12. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces UAL-754 et UAR-900 sur des extraits d'ADN microbien, purifiés sur colonne de Chelex-100, qui provenaient de sols différemment amendés par des boues résiduelles et inoculés par des cellules cibles.....	66
13. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces UAL-754 et UAR-900 sur de l'ADN microbien extrait, par le protocole de Trevors <i>et al.</i> (1992), de sols différemment amendés par des boues résiduelles.....	69

14. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces pA et pH* sur de l'ADN génomique de plusieurs souches bactériennes des espèces <i>S. scabies</i> et <i>S. cavigabies</i> .....	71
15. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces MSTM-1L et MSTM-2C sur de l'ADN génomique de plusieurs souches bactériennes des espèces <i>S. scabies</i> et <i>S. cavigabies</i> .....	72
16. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée sur de l'ADN génomique de certaines bactéries des espèces <i>S. scabies</i> et <i>S. cavigabies</i> ainsi que sur de l'ADN extrait des microorganismes du sol.....	74

## INTRODUCTION

La terre, quoique d'apparence inerte, est un milieu de vie très riche qui renferme une multitude de microorganismes. Les nombreuses activités biologiques effectuées par la microflore du sol ont ouvert la porte à plusieurs recherches portant sur cet écosystème. L'importance de la microflore des sols n'est plus à prouver : nous n'avons qu'à penser aux travaux majeurs de biodégradation et de recyclage effectués par les microorganismes du sol. En effet, directement ou indirectement, tous les restes de la majorité des organismes morts se retrouvent en surface ou enfouis dans le sol et, par la suite, ils disparaissent, transformés en CO<sub>2</sub> et en différentes matières formant le sol. Cette dégradation est accomplie par les microorganismes qui font la conversion des substrats organiques en matières inorganiques et en microéléments, et ceux-ci constituent le matériel nutritif des végétaux aux premiers maillons de la chaîne alimentaire. Cette opération n'est, nous le verrons plus loin, qu'un exemple des activités accomplies par la microflore du sol. Par conséquent, l'écosystème microbien du sol joue un rôle clé dans le soutien de la faune et de la flore de la biosphère, dans la santé publique et dans notre qualité environnementale globale, donc dans le maintien de la vie sur terre (Atlas et Bartha, 1993; Pelczar *et al.*, 1986).

### **Le sol et son écosystème microbien**

#### **Les caractéristiques du sol**

Le sol, qui a souvent été défini comme étant la partie de la croûte terrestre où la géologie et la biologie se rencontrent, est un milieu hétérogène et très complexe qui est composé de trois phases principales : solide, liquide et gazeuse. Ce sont ces trois phases qui, arrangées variablement ensemble au point de vue microscopique et macroscopique, constituent plusieurs centaines de types de sols (Campbell, 1983). La phase solide du sol est formée par le traitement physique, chimique et biologique des roches et des différentes petites particules, des composés

minéraux et des matières organiques (humus) provenant de la décomposition des animaux et des végétaux (Campbell, 1983). La constitution des différents types de sols, qui sont catégorisés de plusieurs façons, est influencée par plusieurs variables telles : le contenu en eau, la température, le pH, la profondeur du sol, l'aération, la luminosité, l'activité humaine, les végétaux qui y poussent et les communautés microbiennes qui y vivent (Campbell, 1983).

### **La microflore du sol**

Les différents facteurs affectant la composition des sols influencent également les populations microbiennes qui y vivent. Effectivement, aux grandes différences dans la composition des sols correspondent les nombreuses différences dans les communautés microbiennes qu'ils contiennent, tant au point de vue du total d'individus que de la diversité des populations présentes (Pelczar *et al.*, 1986). Le sol, souvent considéré comme le milieu microbiologique le plus complexe (Metting, 1985; Stotzky, 1972), est un milieu favorable au développement de plusieurs populations microbiennes. D'ailleurs, très peu d'environnements offrent une aussi grande variété de microorganismes que le sol (Pelczar, 1986). Considérons tout d'abord les quelques chiffres mis en relief au tableau 1. Ils peuvent nous donner une idée de l'importance de la communauté microbienne du sol : un gramme (poids sec) de sol contient généralement plusieurs millions de bactéries, des centaines de milliers de champignons et des dizaines de milliers de protozoaires et d'algues microscopiques (Campbell, 1983). Même si ces données peuvent varier considérablement d'un type de sol à un autre, la biomasse des microorganismes reste toujours de beaucoup supérieure à celle des autres organismes du sol. Cependant, la biomasse microbienne du sol sera toujours infime par rapport à celle des végétaux qui y poussent (Campbell, 1983).

Comme l'illustre le tableau 1, la population bactérienne du sol excède la population de tous les autres groupes de microorganismes, et ce, en nombre et en variété (Pelczar *et al.*, 1986). La

**Tableau 1. Nombres relatifs et biomasses approximatives d'organismes de la microflore et de la microfaune d'un sol fertile.**

Organismes	Nombre		Biomasse (Kg/Ha)
	(par m <sup>2</sup> )	(par g)	
Bactéries	10 <sup>13</sup> -10 <sup>14</sup>	10 <sup>8</sup> - 10 <sup>9</sup>	300-3000
Actinomycètes	10 <sup>12</sup> -10 <sup>13</sup>	10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>	300-3000
Champignons	10 <sup>10</sup> -10 <sup>11</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	500-5000
Algues microscopiques	10 <sup>9</sup> -10 <sup>10</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup>	10-1500
Protozoaires	10 <sup>9</sup> -10 <sup>10</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	5-200
Nématodes	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>1</sup> -10 <sup>2</sup>	1-100
Verres de terre	30-300		10-1000
Autres invertébrés de la microfaune <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>		1-200

Sources : Alexander, 1977; Brady, 1984; Lynch, 1988.

<sup>1</sup> Surtout des arthropodes (insects et crustacés), des ascaris et des mollusques.

raison en est qu'il est possible de trouver dans le sol une grande variété de nutriments et de conditions de croissance nécessaires au support de plusieurs populations bactériennes. On peut en effet y retrouver plusieurs types de bactéries présentant des caractéristiques assez opposées, telles des mésophiles, des thermophiles et des psychrophiles, ou des aérobies, des microaérobies et des anaérobies facultatives et strictes, ou encore des acidophiles et des alcalinophiles (Atlas et Bartha, 1993; Pelczar *et al.*, 1986). Par conséquent, plusieurs genres bactériens sont omniprésents dans le sol (Gray et Parkinson, 1968) où la population de bactéries Gram négatives prédomine sur celle des bactéries Gram positives (Atlas et Bartha, 1993). Les genres qu'on retrouve couramment incluent : *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*

et *Xanthomonas* (les genres bactériens aérobie et anaérobies facultatifs les plus représentés dans le sol sont énumérés au Tableau 2) . De plus, les actinomycètes, surtout ceux des genres *Streptomyces* et *Nocardia*, peuvent représenter à eux seuls de 10% à 33% de la communauté bactérienne totale (Alexander, 1977; Campbell, 1983; Hattori et Hattori, 1976) et avoir une biomasse aussi importante que l'ensemble des autres bactéries du sol (Tableau 1).

**Tableau 2. Proportions relatives des genres bactériens aérobie et anaérobies facultatifs couramment retrouvés dans le sol.**

Genre bactérien	Pourcentage (%)
<i>Arthrobacter</i>	5-60
<i>Bacillus</i>	7-67
<i>Pseudomonas</i>	3-15
<i>Agrobacterium</i>	1-20
<i>Alcaligenes</i>	1-20
<i>Flavobacterium</i>	1-20
<i>Corynebacterium</i>	2-12
<i>Micrococcus</i>	2-10
<i>Staphylococcus</i>	<5
<i>Xanthomonas</i>	<5
<i>Mycobacterium</i>	<5

Source : Alexander, 1977.

Le deuxième groupe de microorganismes le plus représenté dans le sol est celui des champignons (Domsch *et al.*, 1980; Gilman, 1945). En effet, plusieurs espèces de champignons habitent en surface du sol et leur biomasse peut être égale ou même supérieure à celle des bactéries dans

certaines sols (Metting, 1993). Ensuite, viennent par ordre décroissant d'importance les algues microscopiques et les protozoaires qui sont, dans le sol, en diversité beaucoup moins importante que dans les milieux aquatiques (Atlas et Bartha, 1993). Ce sont donc tous ces microorganismes de la flore microbienne en association avec la matière physique du sol et ses caractéristiques qui forment l'entité de l'écosystème microbien du sol (Pelczar *et al.*, 1986).

### **Les interactions microbiennes**

À l'intérieur de l'écosystème du sol, les populations de microorganismes coexistent souvent en association, ou en interaction les unes avec les autres, pour former une communauté microbienne où chaque population contribue à sa maintenance. Certaines de ces associations sont indifférentes ou neutres comme le neutralisme, certaines bénéfiques ou positives comme le mutualisme (symbiose), la protocoopération (synergisme) et le commensalisme, et d'autres sont négatives comme l'antagonisme, l'amensalisme, la compétition, le parasitisme et la prédation (Atlas et Bartha, 1993; Campbell, 1983; Metting, 1993; Pelczar *et al.*, 1986). Les interactions qui ont lieu entre des microorganismes spécifiques n'impliquent pas seulement les microorganismes de l'interaction, mais aussi plusieurs autres microorganismes du sol et les végétaux qui y vivent (Bolton *et al.*, 1993). En effet, les interactions microbiennes peuvent, par exemple, mener à la synthèse de composés qui, une fois rejetés dans le sol, peuvent exercer une influence sur d'autres microorganismes ou sur des organismes supérieurs du sol.

### **Les rôles et les fonctions des microorganismes du sol**

Les nombreuses interactions et activités microbiennes impliquent une pléiade de mécanismes métaboliques et d'opérations effectuées par les microorganismes du sol, qui font de ceux-ci des agents d'une importance capitale dans le bon fonctionnement de cet écosystème. Effectivement, bon nombre d'individus de la microflore du sol jouent des rôles à des niveaux géologiques,



chimiques et surtout biologiques de l'écosystème. Nous n'avons qu'à penser au processus de minéralisation mentionné plus tôt, qui est la conversion microbienne de composés organiques complexes en composés inorganiques simples. Cette conversion fournit en continuité des éléments essentiels qui sont les nutriments des plantes, de certains animaux et, par conséquent, des humains (Pelczar *et al.*, 1986). Donc, les microorganismes du sol jouent un rôle essentiel dans le processus cyclique de la réutilisation des éléments et aident au maintien de la vie sur la terre. De plus, beaucoup d'autres tâches importantes accomplies par les microorganismes du sol au niveau de la dégradation, du recyclage et de la transformation, peuvent être citées en exemple. L'une d'entre elles est certainement la modification et la synthèse biochimique de l'azote et des différents composés azotés lors du cycle de l'azote, effectué entre autres par *Pseudomonas*, *Nitrobacter* et *Nitrosomonas* (Pelczar *et al.*, 1986). Il y a aussi la fixation de l'azote symbiotique et non symbiotique, qui est une étape importante de ce cycle sous la responsabilité de plusieurs bactéries dont : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Clostridium* et *Azotobacter* (Atlas et Bartha, 1993; Pelczar *et al.*, 1986). Un autre processus majeur dans lequel interviennent les microorganismes du sol est le cycle du carbone. Le cycle du carbone, auquel participent étroitement les algues, les bactéries et les champignons du sol (Pelczar *et al.*, 1986), est le plus important procédé de conversion de la biosphère (Bolton *et al.*, 1993), car le carbone est le constituant principal des organismes vivants. En troisième lieu, le soufre, comme l'azote et le carbone, passe à travers un cycle de transformation opéré par des organismes de la microflore du sol comme *Thiobacillus* et *Desulfotomaculum* (Pelczar *et al.*, 1986).

Ces trois cycles dominants de notre biosphère ne sont qu'une partie des éléments et de leurs composés qui sont sujets à l'assimilation et à la dissimilation par les microorganismes du sol. L'activité métabolique de ces organismes transforme biochimiquement et solubilise plusieurs autres éléments comme le calcium, le phosphore, le potassium, le fer, l'aluminium, le manganèse, le silicone, etc. (Atlas et Bartha, 1993; Campbell, 1983; Pelczar *et al.*, 1986). De plus, ces organismes recyclent d'importants polymères tels la cellulose, la lignine et la chitine

(Flanagan, 1978), et ils peuvent même biodégrader des herbicides et des pesticides comme le pentachlorophénol (PCP) (Edgehill et Finn, 1983; Pelczar *et al.*, 1986). Les microorganismes du sol constituent donc la plaque tournante du bon fonctionnement et de la productivité du sol car, en plus de jouer le rôle de producteur primaire de l'écosystème, plusieurs de ces microorganismes effectuent des interactions fondamentales avec des organismes supérieurs. De plus, beaucoup de ces microorganismes du sol possèdent des caractéristiques des plus intéressantes pour la recherche fondamentale et appliquée ainsi que pour les multiples avenues de la biotechnologie.

### **La diversité et la stabilité de la communauté microbienne du sol**

Tout cet assemblage des populations de la microflore du sol constitue une communauté microbienne qui s'est développée au fil du temps. La communauté occupe, dans la hiérarchie écologique, la plus haute marche des unités biologiques d'un écosystème (Atlas et Bartha, 1993). À travers la succession imposée par la sélection naturelle qui, chez les microorganismes, s'effectue à un rythme élevé, les populations de l'écosystème du sol ont évolué jusqu'à atteindre une certaine stabilité dans la communauté microbienne, alors nommée climax (Atlas, 1986). La maturité d'une communauté stable sera le reflet de sa productivité et de sa diversité (Atlas et Bartha, 1993), qui tient compte du nombre, de la distribution et de l'abondance relative des espèces microbiennes en relation avec leur milieu environnemental spécifique (Atlas, 1986). En effet, plus on retrouve de populations microbiennes dans la communauté, c'est-à-dire plus la diversité microbienne est grande, plus il y aura d'activités et de relations inter espèces dans le sol. Dite riche, cette communauté sera très stable, car elle aura une production primaire faible (Atlas et Bartha, 1993), c'est-à-dire qu'elle nécessitera un apport énergétique moindre pour maintenir sa structure. Également, en plus de permettre plus d'associations de qualité entre les espèces, celle-ci sera moins affectée qu'une communauté pauvre par la disparition soudaine de l'une de ses espèces microbiennes (Atlas et Bartha, 1993). Donc, la diversité microbienne se

révèle un paramètre intimement relié à la stabilité de la communauté qui, si instable, pourrait subir des changements draconiens (Atlas, 1986). Effectivement, quoique normalement haute, la diversité microbienne du sol, sous diverses conditions de stress, peut se détériorer et se retrouver très basse, influençant du même coup tout l'écosystème du sol (Atlas et Bartha, 1993).

Les stress environnementaux, provenant de plusieurs origines, peuvent amener des changements majeurs des conditions géochimiques du sol, comme des fluctuations sévères de pH. Ces nouvelles conditions pourraient alors produire des effets néfastes sur les microorganismes pouvant mener à l'inactivation d'activités microbiennes importantes ou à la disparition de certaines populations du sol. Cette déstabilisation risque de conduire à une diminution de la diversité de la communauté microbienne du sol, à une baisse de qualité de certaines interactions microbiennes et à l'empêchement de fonctions effectuées par les microorganismes. Cette situation peut dès lors engendrer un appauvrissement du sol, occasionnant des impacts néfastes sur la vie des organismes supérieurs en relation avec ce sol. Une des causes fréquentes de stress environnemental est le déversement de différents produits sur le sol renfermant des éléments perturbateurs. Ces produits, qui sont d'origine naturelle ou synthétisés chimiquement, peuvent se retrouver sur le sol suite à un accident écologique, ou encore être déversés sur le sol volontairement pour différentes raisons. En effet, ils peuvent être des engrais, des herbicides, des pesticides, etc., mais ils peuvent aussi se présenter sous forme de résidus ou de déchets de différentes sources. Un exemple dont on entend de plus en plus parler et qui retient notre attention, est le cas des boues provenant du traitement des eaux usées municipales. Effectivement, l'épandage de ces boues sur des champs est une avenue de plus en plus envisagée car, en plus d'apporter une solution économiquement avantageuse nécessitant des coûts moindres que d'autres modes de gestion, les boues constituent un fertilisant au potentiel intéressant. Cependant, ces épandages de boues peuvent aussi constituer un élément perturbateur qui pourrait engendrer un stress environnemental sur les microorganismes du sol.

## **Les boues résiduelles provenant du traitement des eaux usées**

### **La situation du traitement des eaux au Québec**

Les boues provenant des usines d'épuration municipales sont le résultat de l'assainissement des eaux, par lequel on vise à débarrasser les eaux usées des polluants chimiques et biologiques, comme les matières organiques, les solides en suspension, le phosphate et les microorganismes, avant de les rejeter dans l'environnement (MENVIQ, 1990). Au Québec, le programme d'assainissement des eaux (P.A.E.Q.), qui a été mis en place en 1978, a permis l'installation d'un système de traitement des eaux usées dans plus de 800 municipalités sur un total de 1478 (Vasseur *et al.*, 1994). En 1991, le pourcentage de la population desservie par un réseau municipal d'assainissement des eaux était de 37% (MENVIQ, 1992) et on prévoit que d'ici peu, les eaux usées de 85% des Québécois devraient recevoir un traitement d'assainissement (Couillard, 1988; Gouvernement du Canada, 1991). Conséquemment à l'augmentation de la proportion d'eaux usées traitées, la production de boues résiduelles s'est accrue considérablement ces dernières années, et la quantité de boues produites annuellement d'ici l'an 2000 devrait atteindre 200000 tonnes métriques (matières sèches) au Québec (Grenier, 1989), et 15 millions de tonnes métriques (m.s.) aux États-Unis (USEPA, 1989). L'identification d'une solution durable pour la gestion de ces énormes quantités de boues constitue donc un défi de taille.

### **La composition des boues d'épuration**

Il existe plusieurs types de traitement des eaux usées au Québec qui varient selon leur efficacité, leur procédure et leur coût. La quantité des boues produites ainsi que leur composition dépend de ces traitements que l'on fait subir aux eaux usées (Vasseur *et al.*, 1994). La composition des boues peut aussi être influencée par la part respective des apports en eau de sources domestiques,

industrielles, commerciales et de ruissellement urbain (Couillard, 1989). En général, on retrouve toujours les mêmes éléments dans les boues; ce ne sont que les concentrations qui varient.

Comme l'un des objectifs poursuivis par l'assainissement des eaux est de réduire leur charge en matières organiques, il va de soi que ces substances composent en bonne partie les boues résiduelles issues du traitement. En effet, le carbone tient la plus grande partie de la portion solide des boues, soit de 30% à 35% (Couillard, 1989; MENVIQ, 1991a; Sommers, 1977). L'azote et le phosphore constituent de 1% à 5% de la teneur en matières sèches des boues (Couillard, 1989; MENVIQ, 1991a; Sommers, 1977). Les boues contiennent aussi des cations échangeables et d'autres oligo-éléments, mais elles sont généralement pauvres en potassium (moins de 1%) (Weetman *et al.*, 1993). Leur teneur en calcium, elle, varie entre 1% et 2%, mais peut atteindre jusqu'à 25% de la teneur en matière sèche pour les boues ayant subi un traitement à la chaux (Couillard, 1989)). Du magnésium, du sodium et des contaminants inorganiques comme des métaux lourds (Cd, Co, Cu, Mo, Ni, Pb, Hg, Al, Cr, Se, Zn, etc.) font également partie des constituants des boues, et ce, en concentration généralement inférieure à 1% du poids sec (Chang *et al.*, 1984).

Les boues résiduelles peuvent contenir des produits qui ont été rajoutés à l'usine d'épuration, comme des coagulants (de l'alun :  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  et du chlorure ferrique :  $\text{FeCl}_3$ ) ou des agents épaississants (polymères). Parmi d'autres produits polluants contenus dans les boues, on peut retrouver les composés organiques de synthèse tels les biphényles polychlorés (BPC), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les phénols, les phtalates, les dioxines, les furanes, etc. (Couillard, 1989). Cependant, on connaît très mal la nature et la quantité des substances synthétiques présentes dans les boues, entre autres à cause de la multitude de composés organiques qui existent (Couillard *et al.*, 1993; Couillard et Grenier, 1990). Finalement, de nombreux microorganismes sont présents dans les boues résiduelles. Effectivement, non seulement une bonne proportion de la biomasse ayant servi à la dégradation

et à la stabilisation des matières solides s'y retrouve (Tchobanoglous et Schroeder, 1987), mais on note aussi une grande contamination biologique due à des intrants d'origine fécale. En effet, ces intrants peuvent contenir divers organismes pathogènes, que ce soient des virus, des bactéries, des protozoaires ou même des helminthes. La présence de ces organismes dépend en grande partie des traitements subis par les boues; le chaulage et l'exposition à des températures élevées (pasteurisation) sont considérés comme les moyens les plus efficaces pour détruire ces agents pathogènes (MENVIQ, 1991b). Les organismes pathogènes les plus souvent recensés dans les boues sont les virus et les bactéries entériques (coliformes) (Payment, 1993; Straub *et al.*, 1993), les protozoaires des genres *Giardia*, *Entamoeba* et *Toxoplasma* (Hays, 1977; Pahren *et al.*, 1979), ainsi que les vers *Ascaris* sp., *Taenia* sp., *Toxocara* sp. et *Trichuris* sp. (Burge et Marsh, 1978; Pahren *et al.*, 1979).

### **Les modes de gestion des boues d'épuration**

L'identification d'une méthode de disposition ou d'utilisation de ces grandes quantités de boues est, comme mentionné ci-haut, un problème majeur auquel font face les stations d'épuration. En effet, les gestionnaires de ce secteur d'activité, qui représente 50% des coûts de fonctionnement d'une station d'épuration (Couillard, 1988; Grenier, 1989; Lester *et al.*, 1983), doivent tenir compte de plusieurs paramètres et contraintes avant de sélectionner le mode idéal de gestion de leurs boues. À l'heure actuelle, il y a plusieurs façons de disposer des boues résiduelles comme : le compostage (Diaz *et al.*, 1993; Diaz-Burgos *et al.*, 1993), la revalorisation de sites miniers ou de carrières (Sopper, 1993), leur utilisation dans certains matériaux de construction ou dans des suppléments alimentaires, etc. (Bastian, 1986; Bowen *et al.*, 1991; Ohshima et Masuta, 1991). Cependant, les méthodes les plus utilisées au Québec sont l'incinération (conversion thermique) (environ 80%), l'enfouissement (environ 13%) et la valorisation (environ 7%) (Couillard et Mercier, 1991; MENVIQ et Ministère de la Faune du Québec, 1995).

## La valorisation des boues d'épuration : les avantages et les inconvénients

Parce que l'incinération et l'enfouissement sont des options très coûteuses et polluantes pour l'environnement (Anderson, 1983; Beauchemin *et al.*, 1993; Couillard, 1989; Grenier, 1989; Hamilton *et al.*, 1984; MENVIQ, 1991a, 1991b; Vasseur *et al.*, 1994), de plus en plus d'usines se tournent vers la valorisation, qui est une meilleure solution au point de vue de l'économie, du rejet de polluants et de la conservation des ressources (Villeneuve et Poniewiera, 1992; Vandal, 1995). D'autres avantages à utiliser la valorisation des boues d'épuration consistent notamment en l'exploitation des propriétés fertilisantes et du potentiel d'amendement des matières organiques et du calcaire contenus dans les boues, pour en faire une ressource naturelle renouvelable, en agriculture surtout, mais aussi en foresterie ou dans les pépinières. En effet, il a été démontré en milieu agricole que les boues, en plus de rendre les sols moins fragiles à l'érosion, constituent un bon fertilisant (Bole et Bell, 1978; Grenier, 1989; Hamilton *et al.*, 1984; MENVIQ, 1991a) parce qu'elles sont riches en éléments nutritifs (carbone, azote, phosphore) recyclés et libérés lentement par la microflore (Brockway, 1988; Couillard, 1989; Grenier, 1989; Hamilton *et al.*, 1984; Parr et Hornick, 1993). Donc, la valeur fertilisante et les propriétés d'amendement organique des boues nous amènent à ne plus les considérer comme un résidu encombrant, mais bien comme une matière recyclable, ce qui va de pair avec la politique de conservation des ressources (Couillard, 1988; Couillard *et al.*, 1993; MENVIQ, 1991a).

Malgré les nombreux avantages qu'offre la valorisation par les boues résiduelles, quelques inconvénients viennent assombrir le tableau. En effet, il est reconnu que des doses excessives d'azote contenues dans les boues peuvent entraîner une forte nitrification et également que les nitrates sont sujets au lessivage et peuvent contaminer les eaux souterraines (Aschmann *et al.*, 1992; Crohn, 1995). De plus, la présence de contaminants organiques et inorganiques dans les boues ainsi que les pHs extrêmes de certaines d'entre elles posent des restrictions majeures à leur utilisation comme engrais (Parr *et al.*, 1983). En effet, le pH et les différents composés que l'on

retrouve dans les boues peuvent perturber de façon considérable la microflore du sol, jusqu'à imposer un stress environnemental important sur cet écosystème et sur les organismes supérieurs qu'il soutient.

De plus, les métaux lourds contenus dans les boues représentent à eux seuls une source de pollution potentielle (Hamilton *et al.*, 1984). Effectivement, même après la mise en place de normes strictes définissant les concentrations maximales à ne pas dépasser dans les boues (Beauchemin *et al.*, 1993), ces métaux peuvent s'accumuler dans les sols (McBride, 1995) et, sous une forme biodisponible, ils pourraient représenter un déséquilibre en oligo-éléments et être nuisibles aux microorganismes du sol en réduisant ou inhibant leurs activités métaboliques ainsi qu'en permettant la disparition d'espèces importantes et l'émergence de populations résistantes aux métaux lourds (Atlas et Bartha, 1993; Campbell, 1983; Duxbury, 1986; Gadd, 1990; Gingell *et al.*, 1976; Martensson et Witter, 1990; McGrath *et al.*, 1988a, 1988b; Mills et Colwell, 1977; Tyler, 1975a, 1975b; Weetman *et al.*, 1993; Witter, 1989). Ces métaux lourds, qui ont la possibilité d'être absorbés par les végétaux et de s'infiltrer par bioaccumulation dans la chaîne alimentaire humaine, peuvent aussi avoir des effets phytotoxiques et diminuer la productivité végétale (Allaway, 1968; Antonovics *et al.*, 1971; Bray *et al.*, 1985; Chaney *et al.*, 1978; Dowdy *et al.*, 1983; Hergstrom et West, 1989; Logan et Chaney, 1983; Maly et Barrett, 1984; Mench *et al.*, 1992; Miller et Boswell, 1981; Sharma *et al.*, 1979; Woodyard, 1986).

Les boues peuvent engendrer un stress environnemental sur le sol par l'introduction d'une flore microbienne importante contenue dans ce résidu. En effet, cette flore peut affecter la diversité microbienne et venir perturber la composition de la microflore du sol; ceci peut nuire à l'exécution des nombreuses fonctions des microorganismes du sol, comme tous les processus de recyclage (Chaudri *et al.*, 1993; Giller *et al.*, 1993) ou de biodégradation. Finalement, le dernier inconvénient de la valorisation des boues se situe dans la présence, même après des traitements de stabilisation, d'organismes pathogènes de plusieurs types. En effet, selon Munger



(1983), les oeufs d'ascaris sont particulièrement résistants et peuvent demeurer viables dans le sol jusqu'à 15 ans après l'épandage des boues. De plus, parmi les virus, certains ont persisté jusqu'à 100 jours (Gaus *et al.*, 1990) et, au mieux, deux à trois mois sont requis, après un épandage, pour ramener les bactéries fécales (coliformes) aux niveaux naturels des sols (Duff *et al.*, 1995; Vasseur *et al.*, 1996). Par conséquent, la transmission possible de maladies infectieuses ou parasitaires au bétail, à la faune ou aux humains fait partie des risques que l'on doit considérer dans l'utilisation des boues comme fertilisants.

### **Les méthodes de suivi et de détection de populations microbiennes dans les sols**

Dans le cas de l'amendement des sols par des boues résiduaires ou du déversement, accidentel ou non, d'autres produits, ainsi que dans la poursuite de tout autre objectif de recherche, plusieurs scientifiques veulent effectuer des suivis de la microflore ou des détections de certaines populations de microorganismes. Les informations recherchées sont surtout relatives au nombre de microorganismes, à la présence de microorganismes spécifiques, à la biomasse des populations et aux différentes activités métaboliques de la flore microbienne du sol (Atlas et Bartha, 1993). Pour obtenir ces informations, on fait appel à plusieurs types de méthodes. Tout d'abord, pour déterminer le nombre de microorganismes présents dans un échantillon, deux approches principales sont utilisées, soit le dénombrement direct ou indirect (Atlas et Bartha, 1993). Le cas de dénombrement direct que l'on retrouve le plus souvent est celui des méthodes de comptage par observations microscopiques (Byrd et Colwell, 1992; Daley et Hobbie, 1975; Frederick, 1965; Gray, 1967; Gray *et al.*, 1968; Harris *et al.*, 1972; Jones et Mollison, 1948). Cette méthode, qui utilise différents types de microscopie et de colorations spécifiques (Atlas et Bartha, 1993; Campbell, 1983), comporte, de façon générale, quelques inconvénients, comme la difficulté de différencier les cellules mortes des cellules vivantes, la sous-estimation du nombre d'individus dans les échantillons contenant beaucoup de débris et l'impossibilité d'effectuer d'autres études sur les organismes observés (Atlas et Bartha, 1993; Pelczar *et al.*,

1986). Pour ce qui est des dénombrements indirects, on peut avoir recours à plusieurs techniques, telles l'hybridation de colonies (Grunstein et Hogness, 1975; Hanahan et Meselson, 1980), l'utilisation de la bioluminescence (Grant *et al.*, 1991; Shaw *et al.*, 1992) ou l'étude statistique du nombre le plus probable (MPN) (Alexander, 1977; Cochran, 1950; Colwell, 1979; Melchiorri-Santolini, 1972; Pourcher *et al.*, 1991). Toutefois, l'approche de base la plus couramment utilisée pour effectuer des dénombrements indirects est le décompte sur milieu de culture. Cette méthode préconise l'utilisation soit d'un milieu spécifique, c'est-à-dire un milieu qui favorise la croissance du groupe microbien désiré, soit d'un milieu différentiel, qui permettra de différencier les microorganismes choisis par rapport aux autres qui ont poussé sur la gélose à l'aide de l'exploitation d'une de leurs caractéristiques spécifiques (Atlas et Bartha, 1993). Malgré les avantages que peut offrir la sélectivité de cette technique, elle représente en fait un désavantage lorsqu'on essaie d'estimer le nombre total d'organismes d'un écosystème. En effet, cette sélectivité empêchera la croissance de beaucoup de microorganismes et, par conséquent, le nombre d'individus décomptés sera alors sous-estimé par rapport au véritable total d'individus de l'échantillon (Atlas et Bartha, 1993; Buck, 1979; Postgate, 1969).

En ce qui concerne la détermination de la biomasse ou l'obtention des mesures d'activités métaboliques de la microflore d'un sol, la tâche est plus ardue et mène à des résultats plus imprécis (Atlas et Bartha, 1993). Les approches majeures pour l'obtention de ces résultats résultent en une corrélation entre diverses expériences biochimiques spécifiques et les microorganismes présents (Atlas et Bartha, 1993; White, 1986). Voici quelques exemples des éléments qu'il est possible d'utiliser dans ce type d'expériences : la présence d'adénosine triphosphate (ATP) dans les microorganismes (Campbell, 1983; Deming *et al.*, 1979; Holm-Hansen, 1969; Paerl et Williams, 1976; Stevenson *et al.*, 1979), les composés des parois cellulaires comme l'acide muramique (King et White, 1977; Millar et Casida, 1970; Moriarty, 1975, 1977, 1978; White *et al.*, 1979), la chitine (Sharma *et al.*, 1977; Swift, 1973; Willoughby, 1978) ou des lipopolysaccharides (Watson *et al.*, 1977; Watson et Hobbie, 1979), certaines

protéines et enzymes spécifiques (uréase, déshydrogénase) (Campbell, 1983), la respiration microbienne (Anderson et Domsch, 1973, 1975, 1978a, 1978b; Campbell, 1983; Jenkinson, 1976; Jenkinson et Powlson, 1976), le potentiel hétérotrophique (Hobbie et Crawford, 1969; Wright, 1973, 1978; Wright et Hobbie, 1965, 1966) et l'incorporation microbienne de nucléotides comme la thymidine tritiée (Campbell, 1983; Van Es et Meyer-Reil, 1982).

Finalement, lorsqu'on recherche des informations sur la présence de populations microbiennes spécifiques, on peut faire appel à des méthodes immunologiques, qui sont surtout basées sur la technique ELISA et des anticorps fluorescents (Atlas et Bartha, 1993; Kingsley et Bohlool, 1981; Miller et Pepper, 1988; Nambair et Anjaiah, 1985), des méthodes phénotypiques ainsi que des méthodes génétiques, ces deux dernières étant, de loin, les plus populaires. La détection phénotypique de microorganismes sous-entend que les organismes cibles constituent une portion significative de l'échantillon et que la caractéristique permettant la détection s'exprime durant leur croissance en culture *in vitro* (Atlas et Bartha, 1993). Cette restriction est fondamentale, car l'approche pour détecter ces microorganismes est de les faire croître, en conditions sélectives, sur un milieu solide ou liquide. Le milieu est spécifique, soit par sa composition en nutriments ou par l'ajout d'agents inhibiteurs, et il permet de démontrer, souvent de façon visible, la caractéristique visée de l'organisme choisi (Atlas et Bartha, 1993). Cette méthode présente deux principaux désavantages : premièrement, plusieurs microorganismes, même très éloignés taxonomiquement, peuvent présenter certains phénotypes très similaires, voir même identiques (Atlas et Bartha, 1993); deuxièmement, la plupart des bactéries du sol, c'est-à-dire jusqu'à 99,9% dans certains cas, ne peuvent être isolées et cultivées en laboratoire (Faegri *et al.*, 1977; Ferguson *et al.*, 1984; Hoppe, 1978; Liesack *et al.*, 1991; Torsvik *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1990). De plus, plusieurs de ces microorganismes, à cause de leurs besoins et de leurs différentes caractéristiques, ne pourront pas coexister dans les mêmes conditions de croissance (Campbell, 1983). Il en résulte que ces études ne peuvent compter, ni sur la présence de toutes les espèces de la microflore du sol, ni sur une représentativité juste de la communauté microbienne. Les

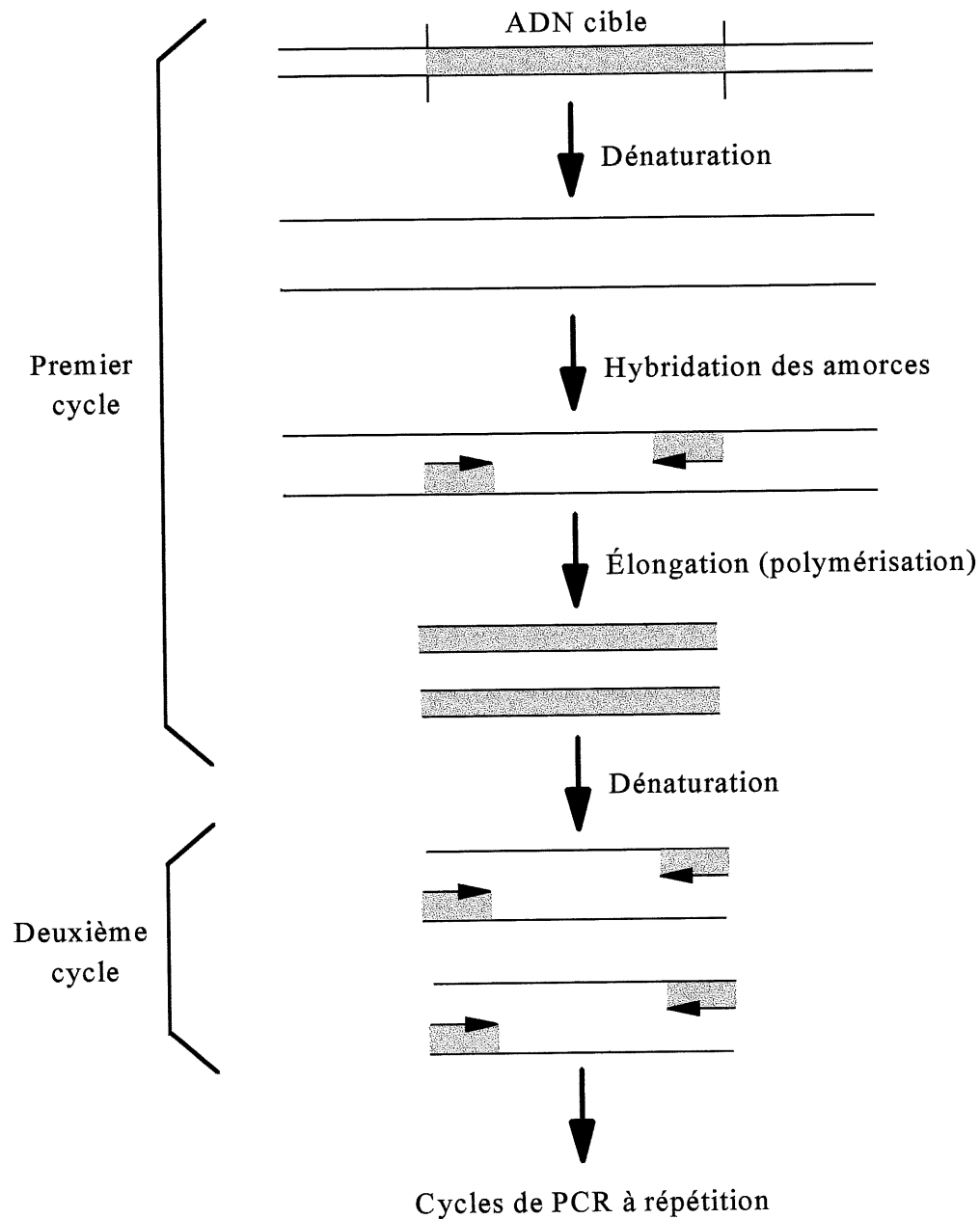
inconvénients majeurs de cette méthode mis en parallèle avec certains avantages des techniques génétiques, comme leur grande spécificité, ont convaincu plusieurs chercheurs de se tourner vers celles-ci. En effet, ces méthodes génétiques, qui sont basées sur l'acide désoxyribonucléique (ADN) préalablement extrait des microorganismes de l'échantillon de sol, sont de plus en plus utilisées, car elles offrent l'avantage de représenter la majorité des microorganismes dans l'extrait. Les méthodes les plus utilisées dans les laboratoires sont l'hybridation d'ADN cible avec une sonde radioactive (Knight *et al.*, 1992; Sayler et Layton, 1990), l'utilisation de gènes rapporteurs, inclus dans des plasmides ou des transposons, qui sont surtout utiles pour traquer des microorganismes modifiés génétiquement (Burlage *et al.*, 1990; Drahos *et al.*, 1986; Frederickson *et al.*, 1988; Ingram *et al.*, 1989; Pillai et Pepper, 1990; Shishido et Pepper, 1990), et l'amplification d'ADN cible par PCR (Polymerase Chain Reaction) (Atlas et Bartha, 1993; Atlas et Bej, 1990; Bej *et al.*, 1990, 1991b, 1991c; Steffan et Atlas, 1988, 1991).

## **La «Polymerase Chain Reaction» (PCR)**

### **L'amplification à l'aide de la PCR**

La technique de la PCR (Mullis, 1990; Mullis *et al.*, 1986; Mullis et Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985, 1988) permet la réplication *in vitro* de séquences définies d'ADN. Une de ses applications est de permettre l'amplification et, par conséquent, la détection de séquences d'ADN ou de gènes spécifiques. Effectivement, en amplifiant exponentiellement un court brin d'ADN cible, la PCR augmente significativement la probabilité de détection d'une séquence, même rare, dans un mélange hétérologue d'ADN (Atlas et Bartha, 1993). Le processus de la PCR est illustré à la figure 1.

La PCR implique la dénaturation de l'ADN pour convertir l'ADN double-brin en simple-brin, la fixation des amorces à la région cible sur l'ADN et la synthèse de nouveaux brins d'ADN



**Figure 1. Illustration de la Polymerase Chain Reaction (PCR) pour l'amplification spécifique d'une séquence d'ADN cible**

grâce à un enzyme, l'ADN polymérase *Taq* («*Taq* DNA polymerase»), qui fixe les nucléotides un à un à partir de l'amorce. Les oligonucléotides d'environ de 15 à 30 bases qui servent d'amorces, sont en fait des sondes qui peuvent s'hybrider, par ponts hydrogènes, avec les régions de l'ADN possédant la séquence génétique complémentaire. Les amorces sont ensuite prolongées de façon complémentaire à la séquence d'ADN cible, qui sert de matrice, par l'ADN polymérase *Taq*, qui est un enzyme thermostable provenant de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988) ayant une température optimale située entre 72 °C et 80 °C (Gelfand et White, 1990). Cette étape, qui se fait en présence de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs) libres, résulte en une duplication de l'ADN ciblé au départ. C'est lorsque les nouveaux dimères d'ADN, qui sont devenus les matrices de la prochaine réaction, sont redénaturés et que ce processus est répété à maintes reprises, qu'on obtient une augmentation exponentielle de la quantité d'ADN cible; une simple copie d'une séquence génomique peut être amplifiée spécifiquement par un facteur de 10 millions (Saiki *et al.*, 1988; Scharf, *et al.*, 1986). Il est ensuite facile de détecter ou de visualiser cette nouvelle formation d'ADN dans le mélange hétérogène, car la séquence d'ADN amplifiée est maintenant surreprésentée par rapport aux autres brins d'ADN présents. Il suffit donc d'effectuer une migration classique d'une partie de notre échantillon sur gel d'agarose et de noter l'apparition d'une bande distincte de taille connue. Les éléments principaux nécessaires à la réaction de PCR, qui est réalisée dans un incubateur cyclique automatisé, sont l'ADN, la polymérase *Taq*, les amorces, les dNTPs, l'ADN servant de matrice et les ions magnésium. Les températures imposées sont généralement situées autour de 55 °C pour l'hybridation, de 72 °C pour l'élongation (polymérisation) et de 95 °C pour la dénaturation.

### **Les applications de la PCR**

La PCR, en plus d'être très utile en recherche fondamentale, peut fournir plusieurs applications en écologie microbienne. En effet, cette technique peut être utile pour quantifier, pour

différencier et pour détecter des microorganismes. La quantification et le dénombrement grâce à cette méthode sont toutefois limités, mais la PCR peut donner une idée suffisamment précise de l'importance relative ou de la quantité d'ADN cible, donc des microorganismes présents dans différents échantillons. Un exemple où la quantification à l'aide de la PCR est possible est le titrage des résultats des amplifications avec des tables de statistiques préparées, en faisant correspondre des résultats de PCR avec un nombre de cellules préinoculées dans le sol (Degrange et Bardin, 1995; Picard *et al.*, 1992). Il faut aussi mentionner que plusieurs autres techniques sont utilisées pour quantifier l'ADN amplifié par la PCR. Parmi celles-ci, il y a l'utilisation de la compétition par des quantités connues d'ADN cible et l'utilisation de dNTPs marqués à la radioactivité (Gilliland *et al.*, 1990a, 1990b; Lee *et al.*, 1996; Steffan et Atlas, 1991; Zachar *et al.*, 1993). De plus, de nombreuses équipes de recherche mentionnent utiliser la PCR pour quantifier de l'ARN (Becker-André et Halbrock, 1989; Singer-Sam *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1989). Pour ce qui est de la différenciation de souches microbiennes, la PCR constitue un outil qui est de plus en plus utilisé. Effectivement, plusieurs scientifiques ont prouvé qu'avec la PCR et des sondes particulières, celles-ci étant surtout constituées à partir de séquences répétitives ou de gènes d'ARNr 16S, il était possible de différencier efficacement des espèces microbiennes. Ces différenciations microbiennes peuvent même être effectuées entre des espèces appartenant au même groupe sérologique ou au même pathovar (Bentley *et al.*, 1993; Cancilla *et al.*, 1992; DeBruijn, 1992; Fekete *et al.*, 1992; Goebel *et al.*, 1987; Jensen *et al.*, 1993; Judd *et al.*, 1993; Louws *et al.*, 1994; Mehling *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 1992; Simonet *et al.*, 1991; Strain *et al.*, 1994; Versalovic *et al.*, 1991). D'autres recherches ont démontré qu'il était possible de distinguer, surtout avec des détections spécifiques d'ARNm, les cellules vivantes des cellules mortes d'une même espèce présentes dans un échantillon (Bej *et al.*, 1991b; Impraim *et al.*, 1987; Mahbubani *et al.*, 1991; Paabo *et al.*, 1988). La troisième application de la PCR, la détection microbienne, est la plus répandue. En effet, celle-ci, qui est un outil de choix en surveillance environnementale (Atlas et Bej, 1990; Bej *et al.*, 1990, 1991d; Josephson *et al.*, 1991; Steffan et Atlas, 1988), est une technique qui, en plus d'être sensible et très

spécifique, a l'avantage de permettre l'identification et la détection d'organismes qui représentent un danger potentiel ou qui ne peuvent croître en laboratoire (Bej *et al.*, 1991b; Josephson *et al.*, 1991; Liesack *et al.*, 1991; Steffan et Atlas, 1988). De plus, cette technique, qui ne nécessite pas le marquage radioactif des sondes moléculaires, est très rapide comparativement aux méthodes de détection traditionnelles, qui peuvent s'échelonner sur 3 à 4 semaines avant de permettre l'identification de l'espèce (Lovett, 1987). Cependant, la PCR comporte tout de même quelques inconvénients, comme la difficulté d'amplifier certains ADN cibles, la possibilité d'amplifier des séquences d'ADN non spécifiques, qui produisent des résultats faux-positifs (Kwok et Higuchi, 1989), et l'inhibition de l'enzyme lorsque de faibles quantités de substances contaminantes sont présentes (Higuchi, 1992; Muller-Wegener, 1988; Steffan *et al.*, 1988; Tsai et Olson, 1992a). Malgré tout, l'amplification par la PCR représente une alternative très prisée qui comporte plusieurs applications en écologie microbienne, comme en fait foi sa grande utilisation lors de détections microbiennes ou de suivis de microorganismes spécifiques dans des échantillons environnementaux (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Bej *et al.*, 1990, 1991a; Brauns *et al.*, 1991; Degrange et Bardin, 1995; Holben *et al.*, 1988; Josephson *et al.*, 1991; Kerkhof, 1994; Khan et Cerniglia, 1994; Pillai *et al.*, 1991; Tsai et Olson, 1992a; Voordouw *et al.*, 1989).

### **L'obtention d'ADN microbien provenant d'échantillons environnementaux**

Si on veut utiliser la PCR dans des études d'écologie microbienne, il est nécessaire d'obtenir l'ADN microbien provenant du milieu environnemental étudié. En effet, il faut, comme première étape, extraire l'ADN des microorganismes présents dans l'échantillon donné. Par la suite, pour permettre des amplifications valables et efficaces, il est important de purifier adéquatement cet ADN microbien. Ces deux étapes d'extraction et de purification deviennent fondamentales pour effectuer des suivis et des détections de microorganismes dans des échantillons environnementaux par la PCR.



## **La première étape pour l'obtention d'ADN microbien : l'extraction de l'ADN**

Deux approches sont utilisées pour extraire l'ADN microbien dans les échantillons environnementaux. Premièrement, l'extraction indirecte (extraction cellulaire), qui consiste à isoler les cellules microbiennes présentes dans l'échantillon et ensuite à les lyser pour en obtenir l'ADN, et deuxièmement, l'extraction directe, où on lyse les cellules directement dans le milieu pour ensuite dégager l'ADN des débris cellulaires et du reste du milieu (Steffan *et al.*, 1988). Plusieurs méthodes d'extraction d'ADN microbien ont été mises au point depuis deux décennies et ce, surtout pour des échantillons de sol. Effectivement, on note depuis quelques années le développement de beaucoup de techniques d'extraction d'ADN des microorganismes du sol. Les premières méthodes d'extraction d'ADN des microorganismes du sol rapportées sont des techniques indirectes introduites par Balkwill *et al.* (1975) ainsi que par Goksoyr et ses collègues (Faegri *et al.*, 1977; Torsvik et Goksoyr, 1978). Ensuite, plusieurs équipes de recherche ont utilisé ces approches en leur apportant quelques modifications (Bakken, 1985; Holben *et al.*, 1988; Jansson *et al.*, 1989; Steffan *et al.*, 1988; Steffan et Atlas, 1988; Torsvik, 1980; Torsvik *et al.*, 1990). Pour ce qui est des méthodes directes, qui offrent généralement un rendement supérieur en quantité d'ADN obtenue comparativement aux méthodes indirectes, la première a été décrite par Ogram *et al.* (1987) et elle a ouvert la voie à plusieurs autres techniques intéressantes, dont quelques-unes seront abordées dans cet ouvrage (Bruce *et al.*, 1992; Picard *et al.*, 1992; Porteous et Armstrong, 1991; Selenska et Klingmuller, 1992; Smalla *et al.*, 1993; Steffan *et al.*, 1988; Tebbe et Vahjen, 1993; Trevors *et al.*, 1992; Tsai et Olson, 1991; Volossiuk *et al.*, 1995).

## **La deuxième étape pour l'obtention d'ADN microbien : la purification de l'extrait d'ADN**

Suite à l'obtention de l'ADN microbien, une série de traitements doit être accomplie sur cet

extrait brut, car il ne peut être utilisé directement pour l'amplification par PCR. En effet, cet extrait d'ADN doit subir une purification rigoureuse pour éliminer de l'échantillon les composés qui ont été co-extraits avec l'ADN. Les impuretés organiques, qui sont surtout contenues dans des extraits d'ADN provenant du sol, sont majoritairement des substances humiques, particulièrement des acides humiques et des acides fulviques, qui sont omniprésentes dans le sol (Atlas et Bartha, 1993; Smith *et al.*, 1993; Thurman *et al.*, 1988). Pour effectuer des réactions de PCR adéquates, il faut donc absolument débarrasser les extraits d'ADN de ces substances brunâtres, car il a été rapporté antérieurement que celles-ci, même en quantités infimes, peuvent inhiber la PCR et causer des résultats faux-négatifs (Higuchi, 1992; Muller-Wegener, 1988; Steffan *et al.*, 1988; Tsai et Olson, 1992a). De plus, les métaux lourds, qui constituent un des polluants potentiels des sols, particulièrement des sols ayant été amendés par des boues résiduelles, peuvent aussi se retrouver dans les extraits d'ADN des microorganismes du sol. Par ailleurs, les métaux lourds sont aussi des agents pouvant interférer avec l'enzyme de la PCR (Higuchi, 1992) et diminuer la spécificité de la PCR (Saiki *et al.*, 1988). Par conséquent, plusieurs méthodes pour éliminer ces contaminants ont été développées; la plupart d'entre elles sont basées sur une séparation physique (filtration, ultracentrifugation, dialyse), sur une extraction par solvants (phénol : chloroforme : alcool isoamylique, éthanol, fréon, guanidine isothiocyanate), ou encore par chromatographie (Sephadex, hydroxylapatite, Chelex, poudre de verre) (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Fuhrman *et al.*, 1988; Holben *et al.*, 1988; Jacobson et Rasmussen, 1992; Ogram *et al.*, 1987; Paul *et al.*, 1990; Romanowski *et al.*, 1992; Selenska et Klingmuller, 1992; Smalla *et al.*, 1993; Steffan *et al.*, 1988; Torsvik *et al.*, 1990; Tsai et Olson, 1991, 1992b; Weller et Ward, 1989).

### **La situation et les objectifs de la recherche**

Ce travail fait partie du projet multidisciplinaire de STRatégies d'OPTimisation d'Écosystèmes Régionaux (STOPER). Le projet STOPER voulait, d'après son objectif général, déterminer sous

quelles conditions l'implantation d'une stratégie environnementale à pollution zéro peut être développée avec une création nette de bien-être (Chornet *et al.*, 1992). Il visait entre autres à fournir un outil d'aide à la décision pour la gestion des déchets et des résidus à l'échelle d'un écosystème régional (Chornet *et al.*, 1992) et, corollairement, un de ses sous-projets avait comme objectif d'évaluer les altérations environnementales causées par une fertilisation agricole ou sylvicole avec des boues résiduaire. Le sous-projet concernant la valorisation des boues provenant du traitement des eaux usées municipales comportait une analyse d'impacts à trois niveaux : une étude portait sur la communauté végétale forestière (Cloutier, 1995), une autre sur la chaîne alimentaire humaine (Lefebvre, 1996) et la présente, portant sur la microflore du sol.

Ce travail, qui avait comme objectifs principaux d'évaluer les impacts d'une fertilisation de boues résiduaire sur la microflore des sols, de mettre au point une technique de détection de microorganismes présents dans des sols amendés par des boues et de développer une technique pouvant différencier certaines espèces de *Streptomyces*, était subdivisé en trois volets. Le premier volet avait pour but de vérifier si un épandage avec des boues résiduaire pouvait engendrer des variations du nombre de bactéries présentes dans les sols amendés. Le deuxième volet visait à déterminer si les normes québécoises actuelles régissant la valorisation des boues sont adéquates, en égard à la teneur en métaux lourds qu'elles contiennent. Il s'agissait donc de vérifier si des épandages de boues peuvent provoquer une augmentation des populations bactériennes résistantes aux métaux lourds dans les sols. Les résultats de ces deux premiers volets du travail ont été obtenus par décomptes bactériens. Finalement, le dernier et le plus important des trois volets de ce projet de recherche avait comme objectif le développement d'une technique efficace de détection microbienne pour les sols valorisés par des boues résiduaire. Cette technique devait ensuite être utilisée, toujours dans le cadre de cette recherche, pour vérifier la présence possible de coliformes dans des sols ayant reçu différentes doses de boues. Par la suite, la technique mise au point pourra servir d'outil dans des études impliquant des détections et des suivis microbiens ou dans tout autre projet de recherche relatif à l'écologie

microbienne de sols valorisés ou non par des boues provenant d'usine d'épuration. Pour l'élaboration de cette technique de détection, une méthode d'extraction de l'ADN des microorganismes du sol ainsi qu'une technique de purification de cet ADN devaient être développées et optimisées. Ensuite, l'étape de détection en tant que telle, qui est basée sur l'amplification d'ADN par PCR, a été mise au point et expérimentée. De plus, des sondes moléculaires créées pour servir d'amorces dans une réaction de détection spécifique par PCR, ont servi aux différenciations d'espèces de *Streptomyces*.

## **CHAPITRE 1**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **1.1 Les dénombrements de la population bactérienne des sols ayant subi divers amendements par des boues résiduelles (méthodologie du volet 1)**

Comme mentionné en introduction, l'amendement des sols par des boues résiduelles peut représenter une cause de stress environnemental. Ainsi, une modification de la microflore du sol pourrait représenter une des conséquences possibles d'un épandage de boues. L'objectif poursuivi dans le premier volet de ce travail était de vérifier, d'une façon générale, si la communauté bactérienne du sol variait, c'est-à-dire si le nombre de bactéries augmentait ou diminuait suite aux déversements de boues d'épuration sur des sols. Pour ce faire, un suivi par décomptes bactériens a été effectué.

##### **1.1.1 Le sol utilisé pour les décomptes bactériens**

Le sol utilisé pour ce premier volet des travaux était un terreau commercial de marque «Top Soil» vendu en sac de 30 l. Celui-ci était constitué d'une terre pulvérisée et tamisée qui contenait 56,2% d'humidité à l'achat. Des échantillons de cette terre ont été valorisés en laboratoire à petite échelle par différentes doses de boues résiduelles. Par la suite, les décomptes bactériens ont été effectués.

##### **1.1.2 L'amendement des sols et les boues utilisées**

Les boues ayant servi à amender les sols ont été recueillies en avril 1995 à l'usine d'épuration des boues de la municipalité de Lac Mégantic (Québec, Canada). Les boues ont été transportées

dans des bouteilles de polypropylène de 1 l (Nalgene; Nalge Co., Rochester, N.Y., USA) et conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Ces boues pâteuses déshydratées contenaient 14,5% de matières sèches et leur bulletin d'analyse est donné en annexe A-VI. Le sol a été disposé à raison de 2 l par pot de plastique de 5 l. La surface du sol représentait donc 0,0254 m<sup>2</sup> et sa profondeur était de 12 cm. Une fois les échantillons de sol distribués, ils ont été gardés à la température de la pièce et humidifiés deux fois par semaine. Le sol a été traité avec quatre doses de boues résiduelles (voir Tableau 3), à raison de trois réplicats pour chacune d'elles. Les échantillons ont été amendés une semaine suivant la première humidification en mélangeant les boues avec les cinq premiers centimètres du sol.

**Tableau 3. Doses de boues résiduelles valorisées à petite échelle sur les échantillons de sol en pot.**

Traitement	Boues <sup>1</sup> ajoutées		Quantité d'N disponible (Kg/ha)	Rapport avec la dose max. <sup>2</sup>
	(g/pot)	(Kg m.s./ha)		
Série A	0	0	0	Témoin
Série B	27,5	157	33,8	25 %
Série C	107,5	614	135	100 %
Série D	129	736	162	120 %

<sup>1</sup> Boues d'épuration de Lac Mégantic décrite dans le bulletin d'analyse inclus à l'annexe A.

<sup>2</sup> Selon les normes permises par le Guide des bonnes pratiques de valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales du MENVIQ (1991b).

### 1.1.3 Le suivi et la méthode d'échantillonnage des sols amendés

Les trois réplicats des quatre traitements de terre à l'étude ont été échantillonnés à cinq reprises. En effet, ils ont été échantillonnés une fois avant et quatre autres fois suivant les amendements des sols, soit après une période de 2 jours, 1 semaine, 2 semaines et 27 semaines (6 mois) après

qu'ils aient reçu les boues d'épuration. Pour chaque pot, deux échantillons de 5 g de sol ont été collectés dans les dix premiers centimètres à partir de la surface du sol. Les échantillons de sol ainsi recueillis ont été utilisés tout de suite après leur obtention.

#### **1.1.4 Le traitement des échantillons de sol pour les décomptes bactériens et le milieu de culture utilisé**

Après le mélange des deux échantillons de 5 g de sol de chaque pot, 1 g de la mixture a été recueilli et pesé. Ensuite une solution de NaCl 0,9% (p/v) a été rajoutée à ce gramme de sol jusqu'à l'obtention d'un volume de 10 ml et la mixture fut vortexée à haute vitesse pendant 2 min pour bien libérer les bactéries liées aux particules du sol. Par la suite, à partir de cette solution homogène, des dilutions en série ont été effectuées et inoculées sur le milieu NA (Nutrient Broth [8 g/l] + 1,7% [p/v] Agar; Difco Laboratories, Détroit, Michigan, USA) en duplicata. Ce milieu riche ne contenant aucun élément sélectif particulier permet la croissance du plus grand nombre de bactéries possible, celui-ci est appelé *le nombre de bactéries viables totales*. Le milieu fut supplémenté avec 50 mg/l de cycloheximide (Sigma Chemical Co., St-Louis, Mis., USA) pour empêcher la croissance des champignons. La croissance bactérienne s'est ensuite déroulée à la température de la pièce et les colonies furent comptées de 3 à 5 jours après l'inoculation.

### **1.2 Les dénombrements des populations bactériennes résistantes aux métaux lourds dans les sols fertilisés avec des boues résiduaires (méthodologie du volet 2)**

La vérification de la hausse possible des populations résistantes aux métaux lourds dans la communauté bactérienne des sols amendés fut effectuée par décomptes bactériens. En effet, comme une augmentation de la concentration d'un métal lourd dans le milieu peut, par sélection naturelle, provoquer un accroissement du nombre de bactéries résistantes à ce métal,

l'observation d'une hausse notable de la population bactérienne résistante à un métal lourd pourrait confirmer une trop grande concentration de ce métal dans les boues valorisées.

### **1.2.1 Les sites d'échantillonnage**

Cinq sites d'échantillonnage ont été choisis pour les fins de cette étude. Deux de ces sites sont situés dans la région de la municipalité de Princeville (Québec, Canada) et les trois autres sont situés dans la région de la municipalité de Lac Mégantic (Québec, Canada). Ces deux municipalités ont été parmi les premières au Québec à s'être dotées d'un plan de valorisation agricole des boues résiduelles. Les cinq sites d'échantillonnage sont des terres exploitées par des agriculteurs indépendants. Ces terres ont été fertilisées avec des boues résiduelles provenant du traitement des eaux de leur municipalité respective. Les bulletins d'analyse des boues d'épuration utilisées pour les sites traités sont donnés à l'annexe A (A-II à A-V, A-VII et A-VIII). Les terres agricoles choisies pour faire partie de l'étude avaient été amendées à une ou deux reprises, et ce, à différents temps. Les terres sélectionnées ainsi que les dates de fertilisation sont indiquées au tableau 4. Il est à noter que les terres ayant subi deux fertilisations n'ont pas reçu une quantité totale de boues supérieure aux terres n'ayant reçu qu'un seul épandage. La quantité des boues épandues sur ces terres agricoles variait entre environ 36,5 et 64 Kg d'azote disponible par hectare (Kg d'N disp./ha). Cela représentait entre 27% et 47% de la dose maximale permise par le guide des bonnes pratiques du MENVIQ (1991b). Finalement, il faut mentionner que, pour chacun des cinq sites sélectionnés, une parcelle de terrain n'ayant pas reçu de boues d'épuration a aussi été échantillonnée pour servir de témoin négatif, ceci portant à dix le nombre de parcelles à l'étude.

### **1.2.2 L'échantillonnage des sols**

L'échantillonnage des parcelles de terrain non fertilisées (témoins) et fertilisées par des boues



**Tableau 4. Sites d'échantillonnage sélectionnés pour les décomptes des bactéries du sol résistantes aux métaux lourds.**

<b>Sites d'échantillonnage</b>	<b>Dates d'amendement</b>
Lac Mégantic A	1989
Lac Mégantic B	1990 + 1991
Lac Mégantic C	1992
Princeville A	1993
Princeville B	1993 + 1994

a été réalisé au cours du mois de juillet 1994, soit, relativement aux différents champs étudiés, après des périodes variant de 5 ans à 2 mois suivant la fertilisation. Pour chacun des dix terrains de l'étude, 15 aliquots de sol ont été recueillis au hasard sur la totalité de la parcelle. Les collectes de sol se sont effectuées à l'aide d'une tarière tubulaire métallique dans les douze premiers centimètres à partir de la surface du sol. Il est à noter que la tarière métallique était rincée avec de l'éthanol entre chaque cueillette de terre. Les 15 «carottes» de sol ainsi obtenues pour chaque parcelle ont été regroupées cinq par cinq et mélangées ensemble pour former trois échantillons combinés de sol. Tous ces échantillons combinés de sol ont été conservés de 3 à 7 jours à 4 °C à l'obscurité jusqu'à leur utilisation pour les décomptes de bactéries résistantes aux métaux lourds. Ces échantillons ont aussi subi une analyse de leur contenu en métaux lourds disponibles. Cette analyse, portant sur quatre métaux, dont trois des sept métaux lourds de cette étude (Cd, Cu, Pb, Zn), a été effectuée par le laboratoire indépendant du D<sup>r</sup> Claude Camiré (Centre de recherche en biologie forestière, Faculté de foresterie et de géodésie, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada). Les bulletins d'analyse sont donnés à l'annexe B.

### 1.2.3 Les métaux lourds étudiés et les milieux de culture utilisés

Au total, 7 métaux lourds ont été sélectionnés pour l'étude, soit : le cuivre (Cu), le cadmium (Cd), le cobalt (Co), le molybdène (Mo), le nickel (Ni), le sélénium (Se) et le zinc (Zn). Chacun de ces métaux a été inclus dans un milieu de culture sous forme d'un sel de métal, en quantité suffisamment grande pour rendre le milieu très sélectif et ainsi permettre la détection des bactéries résistantes au métal lourd ciblé. La concentration du sel de métal à ajouter dans chaque milieu spécifique a été déterminée en laboratoire par l'essai de plusieurs quantités différentes du sel de métal en question. De cette façon, la concentration inhibitrice optimale a été identifiée. Celle-ci, qui est visualisée par une soudaine baisse significative des comptes bactériens, indique la concentration nécessaire de sel métallique à incorporer au milieu pour détecter une augmentation des bactéries résistantes au métal lourd ciblé. La détermination de la concentration inhibitrice optimale a été effectuée par l'ajout, dans le milieu de culture stérile, de différentes quantités des sels de métaux lourds étudiés. Les solutions de ces sels ont été préparées en les dissolvant dans de l'eau distillée et en les stérilisant par filtration sur une membrane (Millex-HV, diamètre des pores : 0,45  $\mu\text{m}$ ; Millipore Co., Bedford, MA, USA). Par cette procédure, les milieux spécifiques pour la détection de la résistance à chacun des sept métaux lourds étudiés ont été élaborés.

Les milieux utilisés avaient comme base le milieu 0,5 NA (Nutrient Agar), constitué de 4 g/l de NB (Nutrient Broth) (Difco Laboratories, Détroit, Michigan, USA) solidifié avec 1,7 % (p/v) de Bacto-agar (Difco Laboratories), auquel un sel spécifique à un métal lourd avait été ajouté : pour le cuivre, 100 mg/l de chlorure de cuivre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; Fisher Scientific Co. Ltd., Ottawa, Ontario, Canada); pour le cobalt, 500 mg/l de nitrate de cobalt hexahydraté ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ; Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, Wis., USA); pour le cadmium, 500 mg/l de nitrate de cadmium hydraté ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ; Fisher Scientific Co. Ltd., Ottawa, Ontario, Canada); pour le molybdène, 1500 mg/l de molybdate d'ammonium tétrahydraté ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ;

Anachemia Inc., Montréal, Québec, Canada); pour le nickel, 500 mg/l d'acétate de nickel ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ni} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ; BDH Inc., Toronto, Ontario, Canada); pour le sélénium, 100 mg/l de sélénium dioxyde ( $\text{SeO}_2$ ; BDH Inc., Toronto, Ontario, Canada) et pour le zinc, 800 mg/l de sulfate de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J., USA). De plus, une série de milieux de référence, c'est-à-dire sans ajout de métal, a aussi été utilisée pour servir de témoin. Dans chaque milieu, 50 mg/l de cycloheximide (Sigma Chemical Co., St-Louis, Mis., USA) furent ajoutés pour empêcher la croissance des champignons.

#### **1.2.4 Le traitement des échantillons de sol pour les décomptes bactériens**

De chaque échantillon combiné, 1 g de sol a été recueilli et pesé. Ce gramme de sol fut ensuite utilisé et inoculé sur les différents milieux contenant les métaux lourds, tel que décrit dans la méthodologie rapportée à la section 1.1.4.

### **1.3 Le développement d'une technique efficace de détection microbienne pour des sols ayant reçu un épandage de boues résiduaires, la vérification de la présence possible de coliformes dans des sols amendés par des boues et la différenciation de certaines espèces bactériennes du genre *Streptomyces* (méthodologie du volet 3)**

La technique développée dans ces travaux, qui est basée sur l'amplification par PCR, nécessite deux éléments fondamentaux pour son utilisation, soit des amorces spécifiques et de l'ADN provenant des microorganismes du sol. L'extraction de cet ADN est donc la première étape à considérer pour l'élaboration de la technique de détection. Ensuite, une fois l'ADN microbien obtenu, celui-ci doit être purifié adéquatement pour permettre son amplification par PCR. Dans le cas des travaux présentés ici, en plus des détections régulières, des bactéries, jouant le rôle de cellules cibles, ont été inoculées dans le sol pour déterminer la validité et le seuil minimal de détection des techniques utilisées et mises au point.

### 1.3.1 Le sol ayant servi aux extractions d'ADN microbien

Deux types de sol ont servi aux extractions d'ADN microbien. Le premier est un sol non agricole provenant d'une pelouse du campus ouest de l'Université de Sherbrooke (Québec, Canada), dont les échantillons ont été recueillis dans les 10 premiers centimètres de la surface du sol, puis tamisés grossièrement et conservés en absence de lumière à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Les échantillons de ce sol ont servi aux essais et à la comparaison des cinq différents protocoles d'extraction d'ADN des microorganismes du sol sélectionnés ainsi qu'aux détections microbiennes de *Streptomyces* sp. dans le sol. Un deuxième type de sol a aussi été utilisé; il s'agit du terreau commercial de marque «Top Soil» décrit dans la section 1.1.1 de ce chapitre (voir tableau 3, série C). Ce terreau, amendé avec des boues, a servi à la vérification de la présence possible de coliformes dans les sols six mois après les amendements, à la comparaison de l'efficacité des techniques de purification ainsi qu'à la détermination de la validité et du seuil minimal de détection de la méthode de détection développée.

### 1.3.2 L'inoculation des bactéries agissant comme cellules cibles

Les inoculations bactériennes ont été effectuées sur une partie du sol valorisé à petite échelle provenant des quatre séries indiquées au tableau 3 (voir section 1.1.1). Ces échantillons de sol, après avoir été autoclavés à 121 °C pour 30 min, furent inoculés avec *Escherichia coli* JM 109. Ces bactéries avaient poussé, jusqu'à leur phase exponentielle à 37 °C, sous agitation dans le milieu LB décrit par Sambrook *et al.* (1989). Par la suite, elles ont été lavées une fois avec un volume de tampon phosphate 10 mM (pH 7.0) (Sambrook *et al.*, 1989), resuspendues dans ce même tampon, puis diluées en volumes de 2 ml avant d'être ajoutées à des échantillons de 10 g de sol. La quantité des cellules contenues dans les échantillons servant d'inoculums fut déterminée par densité optique. Les différentes inoculations bactériennes dans le sol ont été réalisées à raison d'une concentration finale de 100 000, 10000, 1000, 500 et 250 cellules par

gramme de sol (poids humide) et un échantillon de sol n'a pas été inoculé pour servir de témoin. Les échantillons inoculés ont été brassés manuellement 2 min et conservés à la température de la pièce pendant 60 min avant l'extraction pour permettre l'attachement des cellules aux colloïdes du sol.

### **1.3.3 Les protocoles d'extraction d'ADN des microorganismes du sol**

Dans cette recherche, cinq protocoles pour isoler l'ADN microbien du sol ont été expérimentés; le but était d'en identifier le plus adéquat pour les détections microbiennes par PCR. Tous les protocoles ayant été utilisés sont basés sur le type de méthode directe sauf un, qui est une technique indirecte.

#### **1.3.3.1 Le protocole d'extraction d'ADN indirecte de Steffan et Atlas (1988)**

Le seul protocole indirect utilisé dans ces travaux est celui d'extraction de bactéries et de lyse cellulaire décrit par Steffan et Atlas (1988). C'est une méthode qui propose un isolement des cellules du sol à l'aide de centrifugations différentielles et ensuite la lyse de celles-ci à l'aide d'un enzyme, le lysozyme (Sigma Chemical Co., St-Louis, Mis., USA) suivi d'un traitement au détergent SDS (Anachemia Inc., Montréal, Québec, Canada). La procédure citée a cependant été légèrement modifiée. En effet, la resuspension du culot d'ADN issu de la précipitation à -70 °C, dans 10 ml de tampon TE, a constitué la dernière étape exécutée pour ce protocole. Par conséquent, la purification de l'ADN par ultracentrifugation en gradient de CsCl mentionnée n'a pas été exécutée.

#### **1.3.3.2 Le protocole d'extraction d'ADN directe de Bruce *et al.* (1992)**

Ce protocole de Bruce *et al.* (1992), qui est en fait une modification du protocole de Selenska

et Klingmuller (1991), permet une lyse cellulaire grâce à un traitement du sol avec le détergent SDS. La méthode citée a été exécutée de la façon décrite, excepté que la resuspension du culot dans 8 ml de TE, qui suivait l'étape de précipitation, a constitué la dernière étape effectuée pour ce protocole, car la purification par CsCl a été omise.

#### **1.3.3.3 Le protocole d'extraction d'ADN directe de Tsai et Olson (1991)**

Ce protocole, où la lyse cellulaire s'effectue directement dans le sol grâce à l'enzyme lysozyme, le détergent SDS et un traitement de congélation/décongélation, s'est déroulé selon la méthode décrite par Tsai et Olson (1991). Cependant, quelques modifications ont été apportées à cette méthodologie. En effet, la centrifugation à 6000 X *g* suivant l'étape de congélation (-70 °C)/décongélation (65 °C) s'est effectuée sans ajout de phénol et a duré 30 min au lieu de 10 min. Par conséquent, toute la purification d'ADN par le phénol et le chloroforme a été exclue de cette extraction, car une étape semblable était prévue dans le processus subséquent de purification des extraits d'ADN. La procédure s'est donc poursuivie et s'est terminée avec le traitement à la RNase (Ribonuclease; Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada) des 4 ml de surnageant provenant de la centrifugation précédente.

#### **1.3.3.4 Le protocole d'extraction d'ADN directe de Trevors *et al.* (1992)**

Pour ce 4<sup>e</sup> protocole d'extraction, la méthodologie réalisée est celle rapportée par le protocole 1 de Trevors *et al.* (1992) qui inclut deux tampons utiles à la lyse cellulaire, soit un contenant du détergent SDS et l'enzyme protéinase K (Sigma Chemical Co., St-Louis, Mis., USA) et un autre contenant du lysozyme. Quelques étapes du protocole original furent modifiées comme le suggèrent les auteurs. En effet, 0.5 g de PVPP (polyvinylpolypyrrolidone; Sigma Chemical Co., St-Louis, Mis., USA) a été ajouté à la première mixture de l'extraction et celle-ci a été effectuée dans un tube de polypropylène de 50 ml (Nalgene; Nalge Co., Rochester, N.Y., USA)

au lieu d'un vial de verre de 10 ml. Ensuite, contrairement à la méthode de dispersion mentionnée dans la procédure originale, ce mélange fut vortexé à vitesse moyenne pendant 1 min à 20 °C. D'ailleurs, tous les brassages mécaniques du protocole furent effectués de cette façon à l'aide du vortex. De plus, l'enzyme zymolase (Novozyme 234, Novo Biolabs, Danemark) n'a pas été ajoutée au lysozyme (Sigma Chemical Co., St-Louis, Mis., USA) dans le tampon 50 mM Tris-HCl lors de l'étape de lyse cellulaire, car nous ne tenions pas à obtenir l'ADN d'origine fongique. L'extraction s'est ensuite terminée avec l'obtention du surnageant de 15 ml issu de la centrifugation de 10 min à 5000 g (4 °C) suivant le traitement à la RNase (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada).

#### **1.3.3.5 Le protocole d'extraction d'ADN directe de Volossiuk *et al.* (1995)**

Ce dernier protocole étudié comprend une combinaison de deux éléments pour assurer une lyse cellulaire adéquate. En effet, le bris des cellules est assumé par la combinaison d'un traitement mécanique effectué en présence d'azote liquide. La procédure de Volossiuk *et al.* (1995) a été suivie intégralement, sauf que l'ADN résultant des 0,25 g de sol (poids humide) fut resuspendu dans du TE, au lieu de l'eau distillée stérile de la procédure originale. Par cette procédure, l'ADN provenant des microorganismes d'un gramme de sol se retrouvait finalement dans 1 ml de tampon TE.

#### **1.3.4 La visualisation et la quantification de l'ADN extrait des microorganismes du sol**

Tous les extraits d'ADN ont été analysés grâce à l'électrophorèse d'une partie des échantillons sur un gel horizontal de 0,7% d'agarose ultrapure (United States Biochemical, Cleveland, Ohio, USA) dans du tampon TBE 1 X (Sambrook *et al.*, 1989). Il est à noter que les fractions utilisées pour l'électrophorèse provenaient toutes d'extraits d'ADN ayant subi la purification par solvants, tel que décrit à la section 1.3.6.1. Pour ce qui est de la quantification approximative des extraits

d'ADN, elle a été exécutée par comparaison de l'intensité des bandes obtenues avec les bandes de 1 µg du marqueur de poids moléculaire d'ADN du phage lambda digéré par l'endonucléase *Hind*III (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada).

### **1.3.5 L'obtention de l'ADN génomique des bactéries du genre *Streptomyces***

Les souches de *Streptomyces* étudiées ont été isolées, par Faucher *et al.* (1992) ainsi que par Goyer *et al.* (1996), à partir de tubercules de pommes de terre ou de carottes présentant des symptômes de la gale commune. Les souches de *S. scabies* employées furent les suivantes : EF-35, EF-46, EF-54, EF-56 et R90-8 (Goyer *et al.*, 1996; Paradis *et al.*, 1994) ainsi que les souches C-1 et C-6 décrites par Goyer *et al.* (1996). Les souches de *S. caviscabies* étudiées sont EF-83, EF-86, EF-87, EF-88, EF-92 et EF-95 (Faucher *et al.*, 1995; Goyer *et al.*, 1996). L'extraction et la purification de l'ADN génomique de ces souches de *S. scabies* et *S. caviscabies* ont été effectuées suivant la procédure décrite par Hopwood *et al.* (1985). L'ADN génomique qui a été utilisé dans ces travaux nous a été gracieusement offert par Claudia Goyer, étudiante au doctorat dans notre équipe de recherche.

### **1.3.6 La purification des extraits bruts d'ADN isolés des microorganismes du sol**

Ces travaux se sont orientés sur une combinaison de trois méthodes de purification : une extraction par solvants et deux autres par chromatographie. Il est à noter que la purification n'a été effectuée que sur les extraits d'ADN microbien provenant de deux des cinq protocoles d'extraction étudiés dans cette recherche; soit celui de Tsai et Olson (1991) ainsi que celui de Trevors *et al.* (1992).



#### **1.3.6.1 La purification par solvants organiques**

Pour ce premier traitement, qui est basé sur le protocole proposé par Sambrook *et al.* (1989), 2 volumes de phénol saturé en Tris-HCl (pH 8.0) ont été ajoutés à l'extrait brut d'ADN, ou à une partie de l'extrait, et le tout a été brièvement vortexé pour obtenir une émulsion. La mixture a été centrifugée à 6000 X g pendant 20 min et la phase aqueuse du dessus a été collectée. Cette procédure fut répétée à une autre reprise et ensuite 1 volume de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1, v/v/v) a été ajouté à la phase aqueuse collectée. Ce mélange a été brièvement vortexé et centrifugé à 6000 X g pour 20 min. Cette étape a, elle aussi, été répétée et l'extrait en résultant fut repurifié une fois de la même façon avec un volume égal de chloroforme:alcool isoamylique (24:1, v/v), après quoi l'ADN contenu dans l'échantillon a été précipité avec 2,5 volumes d'éthanol à 95% contenant 0,3 M d'acétate de sodium pendant 4 heures à -20 °C. Le culot d'ADN a été obtenu suite à une centrifugation de 20 min à 12000 X g (4 °C) et, après avoir été lavé à l'éthanol à 70%, il a été séché sous aspirateur rotatif (Savant Speed vac SC 110; Fisher Scientific Ltd., Ottawa, Canada) et resuspendu dans 1 ml de tampon TE. C'est une fraction de cette solution d'ADN qui a ensuite été analysée par électrophorèse sur gel d'agarose pour réaliser la comparaison des cinq différents protocoles d'extraction de l'ADN des microorganismes du sol (voir section 1.3.4).

#### **1.3.6.2 Les purifications par chromatographies**

##### **1.3.6.2.1 La purification sur colonne de Sephadex G-200**

La première des deux techniques de chromatographie est une purification par tamisage moléculaire sur colonne de Sephadex G-200 (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada). Le protocole de cette purification, surtout utile pour débarrasser les extraits d'ADN du sol des substances humiques, a été élaboré en référence à la procédure de Tsai et

Olson (1992b). Les colonnes de purification ont été préparées en remplissant des colonnes de polypropylène stérilisées de 2 ml (Bio-spin Columns; BIO-RAD Laboratories Ltd., Mississauga, Ontario, Canada) avec une préparation de Sephadex G-200 saturée avec du TE stérile. Les colonnes ont subi une centrifugation de 5 min à 400 X g afin de permettre, après le rejet du tampon, un deuxième remplissage de chacune avec la préparation de Sephadex G-200. Ensuite, une autre centrifugation de 10 min à 400 X g a été effectuée pour, encore une fois, soutirer l'excédent de TE. Le volume de la matrice de migration de la colonne atteignait alors 1,5 ml après ces deux centrifugations. Par la suite, des aliquots de 50 µl ont été doucement déposés à l'extrémité de la matrice et, après une période de contact de 10 min entre les billes de la matrice et la solution d'ADN, une centrifugation de 10 min à 400 X g a permis de recueillir le filtrat. Il est à noter qu'un tube Eppendorf de 1,5 ml fut fixé avec de la parafilm (American National Can, Neenah, Wis., USA) à l'extrémité des colonnes pour faciliter la cueillette de l'éluant et que toutes les colonnes ont été centrifugées dans des tubes coniques gradués de polypropylène de 50 ml (Falcon; Becton Dickinson, Mississauga, Ontario, Canada). Finalement, à cause d'une quantité de TE toujours présente dans la colonne, le volume de filtrat excédait souvent les 50 µl du départ. Une précipitation de 4 heures de l'ADN avec 2,5 volumes d'éthanol à 95% contenant 0,3 M d'acétate de sodium à -20 °C a donc été rajoutée. Par la suite, le culot d'ADN a été obtenu par une centrifugation de 20 min à 12000 X g et, après le lavage de celui-ci avec de l'éthanol à 70% et son séchage sous aspirateur rotatif (Savant Speed vac SC 110; Fisher Scientific Ltd., Ottawa, Canada), il fut resuspendu dans 50 µl de TE.

#### **1.3.6.2.2 La purification sur colonne de Chelex-100**

La deuxième technique de purification par chromatographie avait comme matrice de base une résine échangeuse d'ions, soit le Chelex-100 (BIO-RAD Laboratories Ltd., Mississauga, Ontario, Canada). Celle-ci, qui a été citée dans des travaux récents de purification d'extrait d'ADN provenant de sols amendés par des boues résiduelles (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Straub *et al.*,

1994, 1995), a été utilisée spécifiquement pour compléter l'élimination des acides humiques et des métaux lourds contenus dans les extraits d'ADN. La méthode de purification sur Chelex-100 a été effectuée telle que décrite par Straub *et al.* (1994) sur certains extraits d'ADN du sol. Ce protocole a été respecté à l'exception que les colonnes n'ont pas été préparées dans des seringues, mais dans les mêmes colonnes de polypropylène que celles utilisées pour la purification sur Sephadex G-200; le volume final de résine atteignant 1,5 ml (0,45 g [poids sec]). Les centrifugations ont été effectuées dans des tubes coniques de 50 ml en polypropylène par la technique décrite ci-haut (section 1.3.6.2.1) et les filtrats résultant de cette purification ont ensuite été utilisés pour les expériences de PCR. Il est à noter que la validité des processus de purification est déterminée par les efficacités d'amplification qu'ils entraînent lors des réactions de PCR. De plus, des comparaisons seront effectuées entre l'efficacité d'amplification des extraits d'ADN ayant subi les trois purifications et certains extraits d'ADN n'ayant pas été purifiés sur une colonne de Chelex-100, et ce, pour des sols valorisés et non valorisés.

### **1.3.7 Les détections et les différenciations de microorganismes par la PCR**

#### **1.3.7.1 Les amorces utilisées pour les réactions de PCR**

Dans ces travaux, trois paires d'amorces ont été utilisées : une pour détecter *E. coli*, et deux autres visant la détection et la différenciation de certaines espèces du genre *Streptomyces*.

Le choix d'utiliser des amorces pour détecter *E. coli* a été effectué en considérant que les détections pouvaient être appliquées à des extraits d'ADN provenant de sols ayant reçu des boues résiduaires, sols pouvant ainsi contenir des coliformes fécaux. Les deux oligonucléotides de 20 et 21 pb sélectionnés ont été rapportés pour la première fois par Bej *et al.* (1991a). Ceux-ci, nommés UAL-754 (5'-AAAACGGCAAGAAAAAGCAG-3') et UAR-900 (5'-ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG-3'), sont homologues aux extrémités d'une région de 0,147

Kb du gène *uidA* d'*Escherichia coli*. En effet, la séquence de l'oligonucléotide UAL-754 est limitée par les paires de bases 754 et 773, et la séquence de l'oligonucléotide UAR-900 est limitée par les paires de bases 880 et 900, de la région 5'-terminale du gène *uidA*, qui code pour la  $\beta$ -glucuronidase chez *E. coli* (Jefferson *et al.*, 1986). Il est à noter que cette paire d'amorces permet la détection des cellules d'*E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positives et négatives ainsi que de quelques espèces appartenant au genre *Shigella*. Elles ont été utilisées dans ces travaux pour la détermination de la validité et du seuil minimal de détection de la méthode développée ainsi que pour la vérification de la présence possible de coliformes dans des sols amendés par des boues six mois auparavant.

Deux autres paires d'amorces ont été utilisées dans cette recherche. Celles-ci sont utiles pour la détection de bactéries du genre *Streptomyces*, qui sont très représentées dans le sol. La première paire d'amorces, décrite par Edwards *et al.* (1989), a été utilisée pour l'amplification d'une séquence d'ADNr 16S de 1,53 Kb. Elle est constituée de deux oligonucléotides de 20 bases appelés pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et pH\* (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). Le deuxième ensemble d'amorces utilisé pour la détection de *Streptomyces* a été créé dans le cadre de cette recherche à partir de deux régions conservées du gène *amy*, qui code pour la synthèse d'un enzyme  $\alpha$ -amylase produit par les bactéries du genre *Streptomyces*. Les séquences d'acides aminés qui ont servi à la synthèse des oligonucléotides sont basées sur les régions 2 et 4 rapportées dans les travaux de Vigal *et al.* (1991). La séquence de nucléotides correspondant aux acides aminés a été identifiée à partir du codon majoritaire de chaque acide aminé rapporté dans l'analyse génétique des patrons des codons du génome des bactéries du genre *Streptomyces* élaborée par Wright et Bibb (1992). Deux sondes dégénérantes de nucléotides ont ainsi été créées; il s'agit de celle de 27 bases identifiée MSTM-1L (5'-GGCTTCCG(CG)ATCGACGC(CG)GC(CG)AAGCAC-3') et celle de 18 bases identifiée MSTM-2C (5'-AAGCA(CG)CTGTTGGTGCTG-3'). Il faut prendre note que les dégénérescences ont été incluses dans les amorces lorsque deux codons majoritaires d'un

acide aminé étaient représentés de façon relativement équivalente.

Les six oligonucléotides constituant les trois paires d'amorces ayant servi aux réactions de PCR de ces travaux ont été synthétisés sur un support solide utilisant un synthétiseur d'ADN automatique (Beckman Oligo 1000 DNA Synthesizer; Beckman Instrument Inc., Fullerton, Ca., USA). Les oligonucléotides ainsi obtenus ont été purifiés sur des micro-colonnes centrifugeables contenant une matrice de Sephacryl S-200 (MicroSpin S-200 HR columns; Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada), tel que recommandé par le manufacturier. Par la suite, les amorces furent dosées par densité optique à 260 nm et leur concentration a été déterminée à l'aide de leur coefficient d'extinction molaire respectif.

### **1.3.7.2 Les réactions d'amplification par PCR**

Les amplifications ont été exécutées dans un incubateur cyclique automatisé programmable (DNA thermal cycler; Perkin-Elmer Cetus Corp., Mississauga, Ontario, Canada). Toutes les réactions de PCR ont eu lieu dans des tubes microcentrifuges stériles de 0,5 ml en polypropylène et les solutions finales ont été recouvertes de 100 µl d'huile minérale légère (Sigma No. M3516; Sigma Chemical Co., St-Louis, Mis., USA) pour empêcher le reflux ainsi que l'évaporation. L'enzyme utilisée pour la totalité de ces travaux fut l'ADN polymérase *Taq* (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada) et le tampon de réaction 10 X pour PCR employé était fourni avec l'enzyme. Celui-ci était constitué de 500 mM KCl, de 15 mM MgCl<sub>2</sub> et de 100 mM Tris-HCl (pH 9,0 à 25 °C). Finalement, les dNTPs ayant servi aux expériences provenaient du même distributeur.

#### **1.3.7.2.1 L'amplification à l'aide des amorces UAL-754 et UAR-900 (détection d'*E. coli*)**

Ces réactions de PCR ont été effectuées à partir d'extraits d'ADN purifiés, soit sur une colonne

de Sephadex G-200, soit sur la combinaison des colonnes de Sephadex G-200 et de Chelex-100. Les extraits d'ADN utilisés dans cette partie des recherches avaient deux provenances. En effet, dans le cas de la vérification de la présence possible de coliformes fécaux, l'ADN provenait du sol non amendé et des sols différemment amendés par des boues (voir section 1.3.1), tandis que dans le cas de la détermination du seuil minimal de détection de la technique d'amplification, l'ADN provenait de ces mêmes sols qui avaient toutefois été inoculés avec des cellules d'*E. coli* juste avant l'extraction (voir les sections 1.3.1 et 1.3.2). Les amplifications ont été réalisées selon le protocole décrit par Bej *et al.* (1991a) à l'aide de 0,5 mM des amorces UAR-754 et UAL-900 sur des aliquots d'ADN purifiés de 10 µl et les volumes réactionnels ont été complétés à 100 µl avec de l'eau distillée stérile. Le cycle de la réaction de PCR inclus dans ce protocole a toutefois été modifié. Effectivement, la dénaturation à 95 °C précédant les cycles a été effectuée pendant 5 min au lieu de 3 min et l'autre dénaturation cyclique d'une minute fut réalisée à 95 °C au lieu de 94 °C. De plus, le nombre total des cycles répétitifs a été porté à 40, comparativement à 25 pour le protocole original, et une étape d'incubation de 20 min à 72 °C a été ajoutée pour compléter l'extension des brins d'ADN amplifiés. Finalement, pour agir comme contrôle positif de la réaction, un tube contenant 1 µg d'ADN d'*E. coli* JM 109, extrait en parallèle par la méthode de Tsai et Olson (1991) décrite à la section 1.3.3.2, a été ajouté comme ADN cible à l'expérience.

#### **1.3.7.2.2 L'amplification à l'aide des amorces pA et pH\* (détection de *Streptomyces* sp.)**

Ces amplifications ont été effectuées à partir de 200 ng d'ADN génomique provenant des bactéries du genre *Streptomyces* ainsi qu'à partir d'aliquots de 10 µl d'un extrait d'ADN des microorganismes d'un sol du campus de l'Université de Sherbrooke (Québec, Canada) (voir section 1.3.1), cet extrait d'ADN ayant été purifié sur colonne de Sephadex G-200. Les amplifications ont été réalisées dans une solution contenant 10 µl du tampon de réaction de PCR mentionné ci-haut, 200 µM de chaque dNTP, 100 pmol de chacune des amorces, 10% (v/v) de

DMSO et 5 U d'ADN polymérase *Taq*, le tout dans un volume complété à 100 µl avec de l'eau distillée stérile. La procédure fut effectuée comme décrite par Mehling *et al.* (1995), à l'exception que l'enzyme utilisée n'a pas été la «Vent DNA polymerase», mais bien la «*Taq* DNA polymerase», et celle-ci a été ajoutée au mélange initial, et non pas après la première dénaturation. De plus, cette dénaturation de 5 min a été effectuée à 95 °C et non à 98 °C comme proposé.

#### **1.3.7.2.3 L'amplification à l'aide des amorces MSTM-1L et MSTM-C2 (détection de *Streptomyces* sp.)**

Les réactions de PCR utilisant ces amorces se sont effectuées à partir de 12 ng d'ADN génomique provenant des souches bactériennes du genre *Streptomyces* ainsi qu'à partir d'aliqots de 10 µl d'un extrait d'ADN des microorganismes d'un sol du campus de l'Université de Sherbrooke (Québec, Canada) (voir section 1.3.1), cet extrait d'ADN ayant été purifié sur colonne de Sephadex G-200. Les réactions ont été réalisées dans une solution contenant 10 µl de tampon de réaction de PCR cité précédemment, 200 µM de chaque dNTPs, 105 pmol de chaque amorce et 2,5 U d'ADN polymérase *Taq*, le tout dans un volume complété à 100 µl avec de l'eau distillée stérile. Les cycles des amplifications ont eu lieu comme suit : tout d'abord, l'ADN cible a été dénaturé à 95 °C pendant 5 minutes et ensuite, un total de 35 cycles répétitifs ont été effectués. Chacun des cycles comportant une dénaturation d'une minute à 95 °C, une étape d'hybridation d'une minute à 55 °C permettant la fixation des amorces et une étape de polymérisation d'une minute à 72 °C servant à l'extension de l'ADN. De plus, une étape de 20 minutes à 72 °C a suivi les 35 cycles pour permettre de finaliser la polymérisation des brins d'ADN nouvellement synthétisés.

### 1.3.7.3 La détection et la visualisation de l'ADN amplifié par PCR

Les produits d'ADN obtenus suite aux réactions de PCR ont été détectés par l'électrophorèse, sur un gel horizontal d'agarose (Agarose type II: medium EEO; Sigma Chemical Co., St-Louis, Mis., USA), d'un aliquot de 10 µl, donc de 1/10 du volume des échantillons d'ADN amplifiés par PCR. Les migrations ont été effectuées dans du tampon TBE 1 X sur des gels de 2% d'agarose pour les expériences de détection d'*E. coli* et sur des gels de 1% d'agarose pour les expériences de détection et de différenciation des *Streptomyces*, selon la procédure décrite par Sambrook *et al.* (1989).



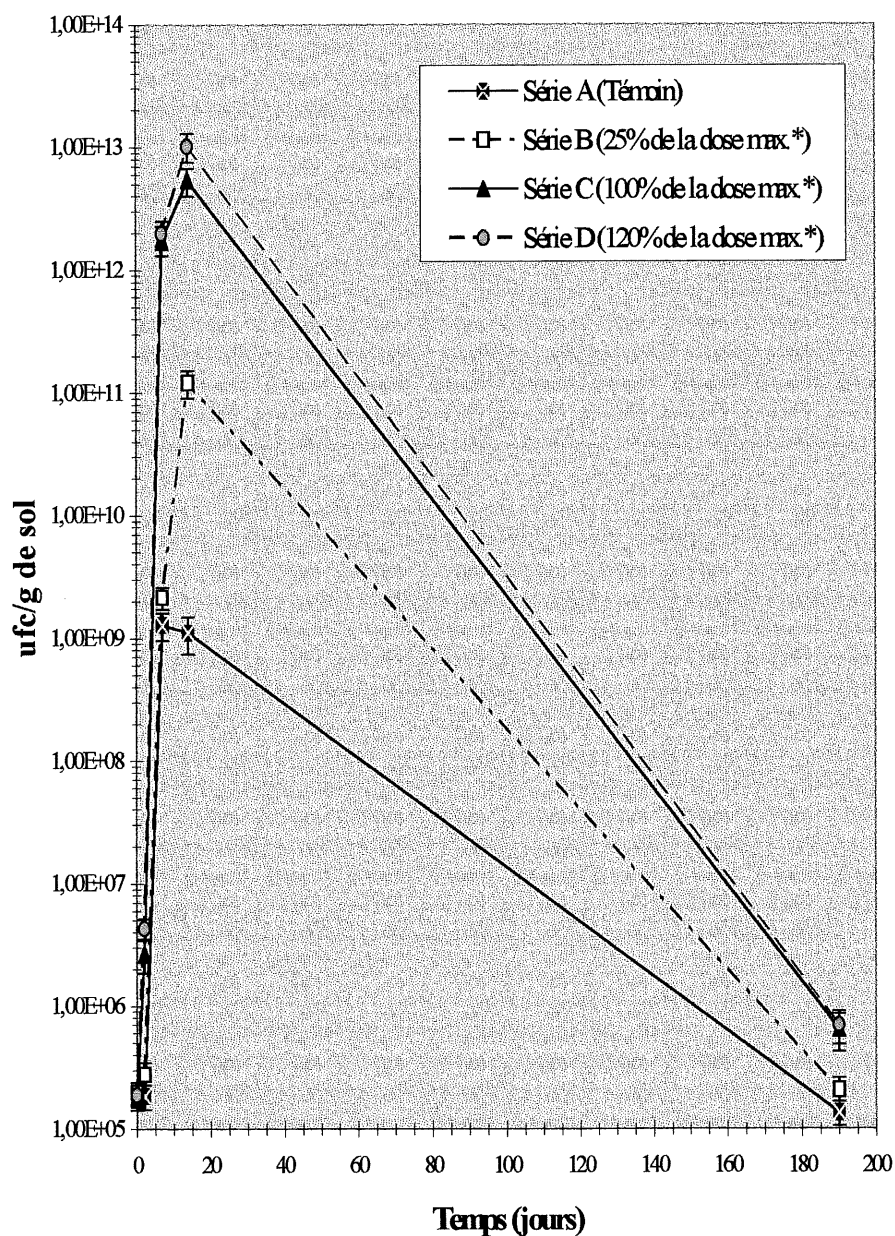
## CHAPITRE 2

### RÉSULTATS

#### **2.1 Les dénombrements de la population bactérienne des sols ayant subi divers amendements avec des boues résiduaires (descriptions des résultats du volet 1)**

L'objectif poursuivi dans ce premier volet était de vérifier si la population bactérienne du sol augmentait ou diminuait par suite d'un déversement de boues d'épuration sur le sol. Pour ce faire, un suivi par décomptes bactériens a été effectué sur quatre différentes séries de traitements d'épandage de boues. Les résultats ont été obtenus à la suite de cinq prises de lecture effectuées sur une période de 190 jours (27 semaines) (Fig. 2).

Les résultats démontrent en premier lieu que dans chacun des sols valorisés, le nombre total de bactéries augmente considérablement pendant les deux premières semaines et diminue ensuite graduellement jusqu'à la 27<sup>e</sup> semaine. On remarque aussi, lors de cette dernière prise de données, que le nombre de bactéries de chaque série d'échantillons était redescendu soit à sa valeur originale, comme c'est le cas pour les traitements A et B, soit à une valeur légèrement supérieure au dénombrement de départ, comme dans le cas des traitements C et D. En effet, après 190 jours, les décomptes bactériens des séries C et D étaient respectivement de  $6,43 \times 10^5$  et de  $6,97 \times 10^5$  ufc/g de sol, comparativement à leur donnée de départ qui était de  $1,83 \times 10^5$  et  $1,89 \times 10^5$  ufc/g de sol. On dénote cependant, contrairement aux trois échantillons traités avec des boues, que le nombre de bactéries a cessé d'augmenter après la première semaine pour la série A, qui servait de témoin. Dans ce cas, le plus haut taux de bactéries, soit  $1,28 \times 10^9$  ufc/g de sol, fut mesuré après la première semaine. Ensuite, une baisse du nombre de bactéries présentes dans le sol s'amorça jusqu'à ce que l'on assiste, après 190 jours, au retour du taux bactérien mesuré initialement.



**Figure 2. Dénombrements de la population bactérienne totale des sols sur une période de 190 jours suivant divers amendements de boues résiduaire**

\* Ces valeurs représentent le pourcentage de la dose maximale d'épandage permise par le guide des bonnes pratiques de valorisation agricole des boues de station d'épuration des eaux usées municipales du MENVIQ (1991b).

On observe également, à la figure 2, que tous les sols ayant reçu des boues renfermaient des concentrations de bactéries nettement plus élevées que celles du témoin et ce, dès la première lecture suivant le déversement des boues sur le sol, soit après seulement deux jours. De plus, ces concentrations bactériennes atteignaient des sommets très élevés, surtout après 14 jours, alors que l'on note des quantités de bactéries variant de  $1,22 \times 10^{11}$  ufc/g de sol (traitement B) à des valeurs surpassant légèrement les  $10^{13}$  ufc/g de sol (traitements C et D), comparativement à  $1,12 \times 10^9$  ufc/g de sol pour la série témoin. Ces chiffres démontrent qu'après la deuxième semaine suivant le déversement d'une quantité de boues équivalente à la dose de valorisation légale, le nombre de bactéries était 5000 fois plus élevé dans ce sol amendé que dans le sol témoin. On peut également noter que même un déversement d'une quantité de boues aussi petite qu'elle représentait seulement 25% de la dose maximale permise, pouvait faire augmenter de façon importante le nombre de bactéries du sol. Effectivement, le taux bactérien du sol traité de la sorte a augmenté immédiatement après l'amendement pour atteindre, après deux semaines, un niveau 100 fois plus élevé que le taux bactérien du sol non traité. Finalement, la comparaison entre la population bactérienne du sol ayant reçu 25% de la dose de boues permise avec celle du sol ayant reçu la quantité de boues maximale, semble indiquer que plus la quantité de boues ajoutées sur le sol était considérable, plus le nombre de bactéries dans le sol devenait élevé et plus l'augmentation de cette concentration bactérienne s'effectuait rapidement. Cependant, les bactéries semblaient atteindre un certain seuil de développement maximal puisque, lorsque la quantité de boues déversée sur le sol était supérieure à la limite légale, les bactéries du sol proliféraient à peu près de la même façon que celles présentes dans le sol ayant reçu la dose de boues maximale permise.

## **2.2 Les dénombrements des populations bactériennes résistantes aux métaux lourds dans les sols fertilisés avec des boues résiduaires (description des résultats du volet 2)**

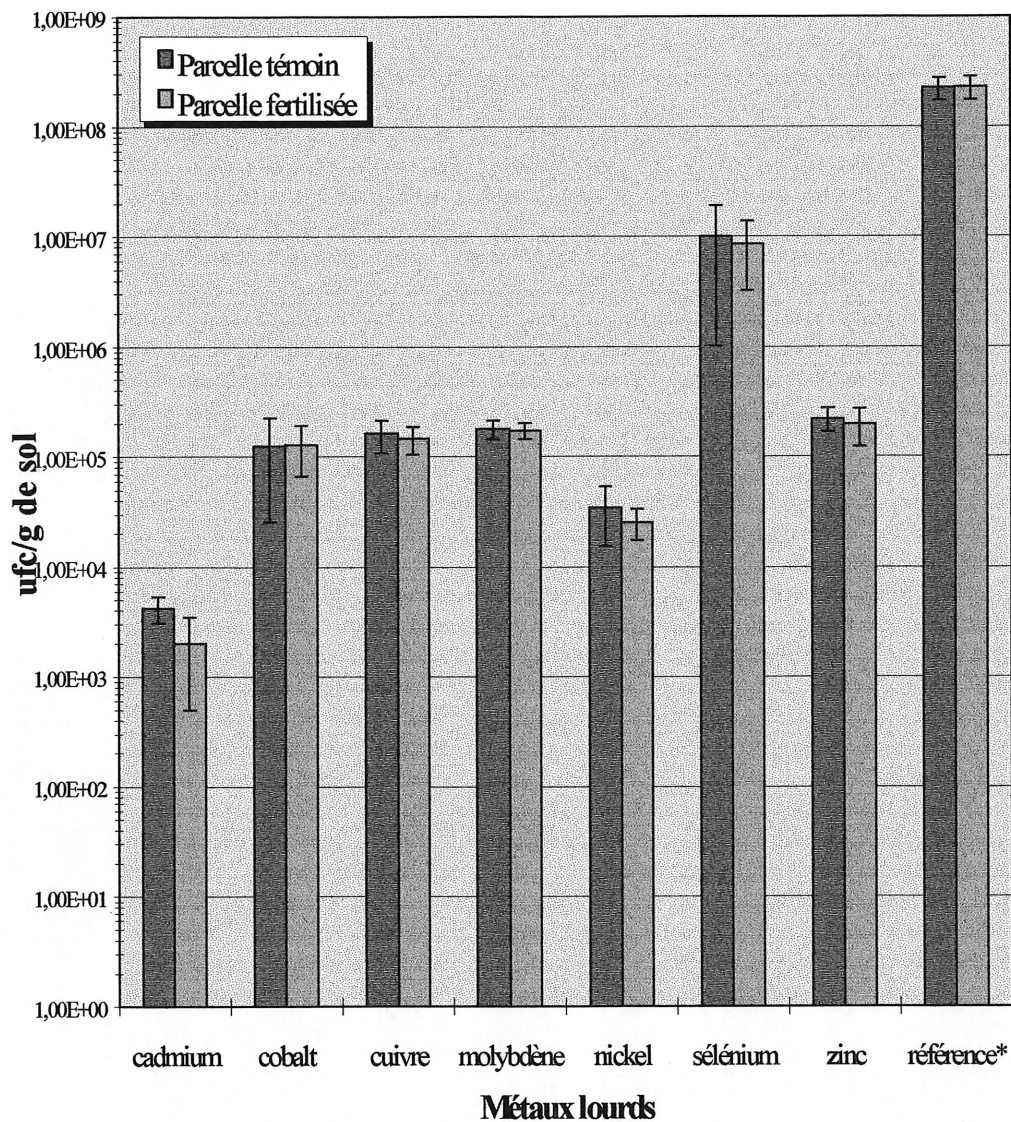
Comme l'objectif de ce 2<sup>e</sup> volet était de vérifier si un amendement de boues résiduaires pouvait mener à une hausse notable de la population bactérienne résistante à un ou des métaux lourds,

des décomptes bactériens ont été effectués sur cinq terres agricoles valorisées à différents temps (voir la section 1.2.1 et le tableau 4). Les résultats, qui ont été obtenus à la suite des dénombrements bactériens sur sept milieux contenant un métal lourd différent en excès, sont représentés sous forme d'histogrammes (Fig. 3 à 7).

Avant de passer à la description de cette partie des résultats, il est nécessaire de mentionner que, comme la proposition de cette étude était de traiter la résistance à chacun des métaux lourds d'une façon séparée et indépendante, il n'y aura aucune comparaison entre les décomptes des sept différents types de populations bactériennes résistantes à un métal lourd particulier. Cette opération serait totalement inutile car, étant donné que les taux bactériens ont été mesurés en laboratoire sur des milieux sélectifs différents pour chaque métal, des analyses entre les populations bactériennes résistantes à différents métaux seraient non pertinentes, puisqu'elles n'auraient aucun dénominateur commun. Cependant, il y aura deux types de descriptions effectuées. Les premières seront basées sur des comparaisons entre les dénombrements des bactéries du sol résistantes à chacun des métaux lourds des parcelles fertilisées et des parcelles témoins d'un même site, tandis que les autres serviront à comparer les cinq sites à l'étude et elles ne concerneront que les taux des populations bactériennes du sol résistantes au même métal lourd. Finalement, il est à noter que, lors des comparaisons de dénombrements bactériens, une différence était jugée significative lorsque les marges d'écart type des résultats concernés ne se recoupaient pas. Ces marges d'écart type sont représentées sous forme de barre d'erreur dans les figures 3 à 7 qui illustrent les résultats traités dans cette section.

### **2.2.1 La description comparative entre les dénombrements de bactéries résistantes à chacun des métaux lourds des parcelles fertilisées et des parcelles témoins de chaque site d'étude**

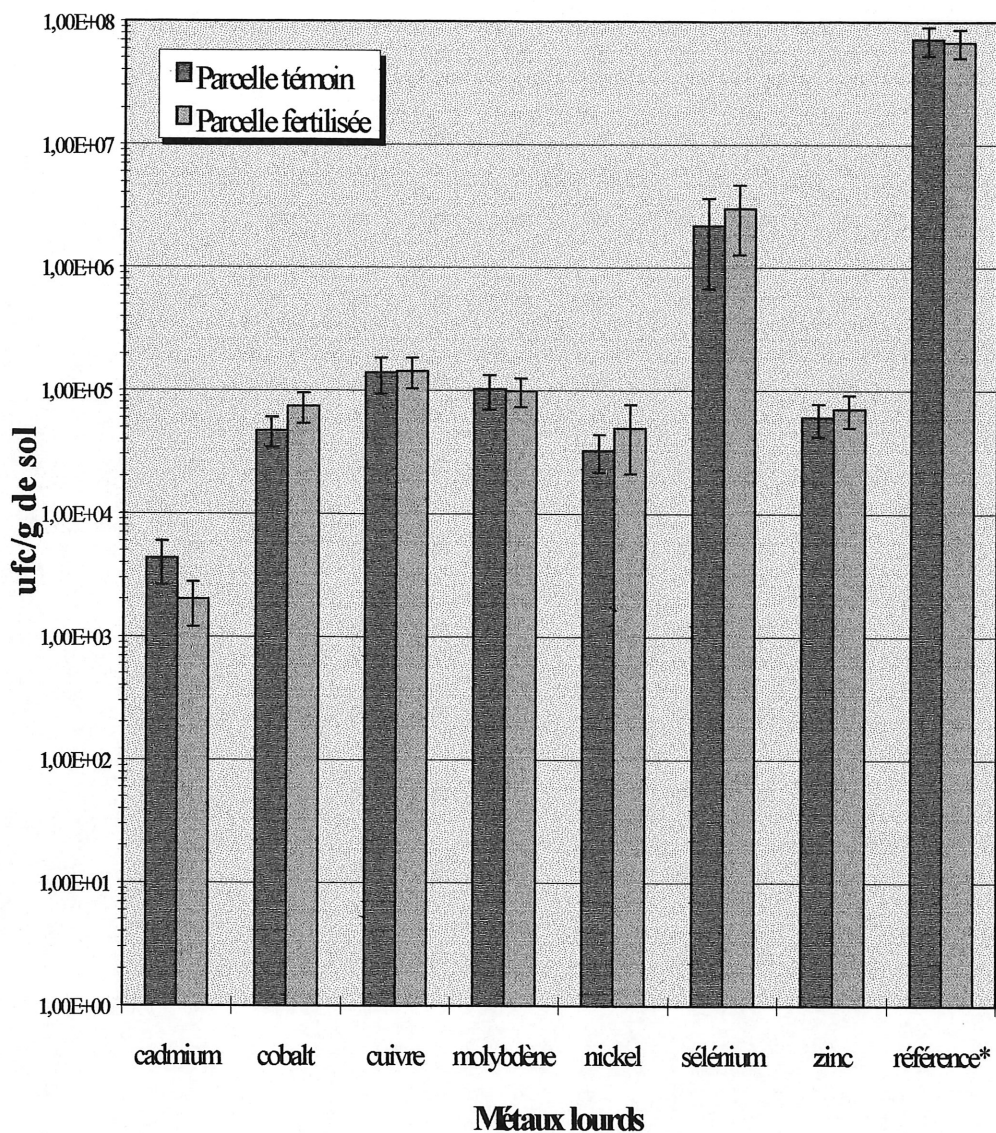
Après la comparaison des concentrations des bactéries du sol résistantes aux divers métaux lourds des cinq sites étudiés, on s'aperçoit que les différences entre les parcelles fertilisées et non



**Figure 3. Dénombrements des bactéries du sol résistantes<sup>1</sup> à sept métaux lourds dans la parcelle fertilisée et la parcelle témoin d'une terre agricole cinq ans après son amendement par des boues résiduelles (site Lac Mégantic A, fertilisé en 1989)**

<sup>1</sup> Les bactéries jugées résistantes sont celles qui ont formé des colonies sur les milieux décrits à la section 1.2.3.

\* Le milieu de référence servait aux décomptes des bactéries totales puisqu'il ne contenait aucun métal lourd.

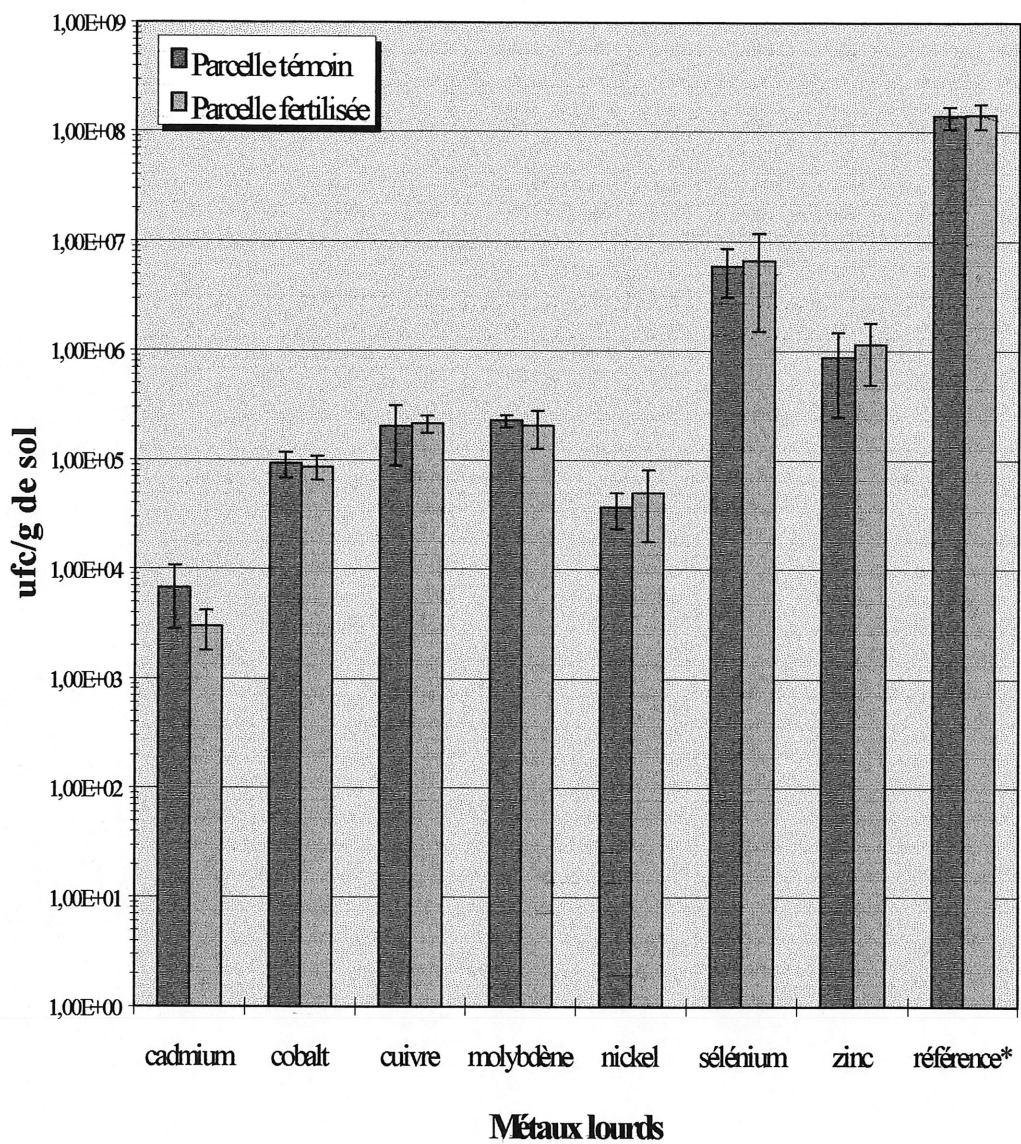


**Figure 4. Dénombrements des bactéries du sol résistantes<sup>1</sup> à sept métaux lourds dans la parcelle fertilisée et la parcelle témoin d'une terre agricole trois ans après son amendement par des boues résiduelles (site Lac Mégantic B, fertilisé en 1990 et en 1991)**

<sup>1</sup> Les bactéries jugées résistantes sont celles qui ont formé des colonies sur les milieux décrits à la section 1.2.3.

\* Le milieu de référence servait aux décomptes des bactéries totales puisqu'il ne contenait aucun métal lourd.

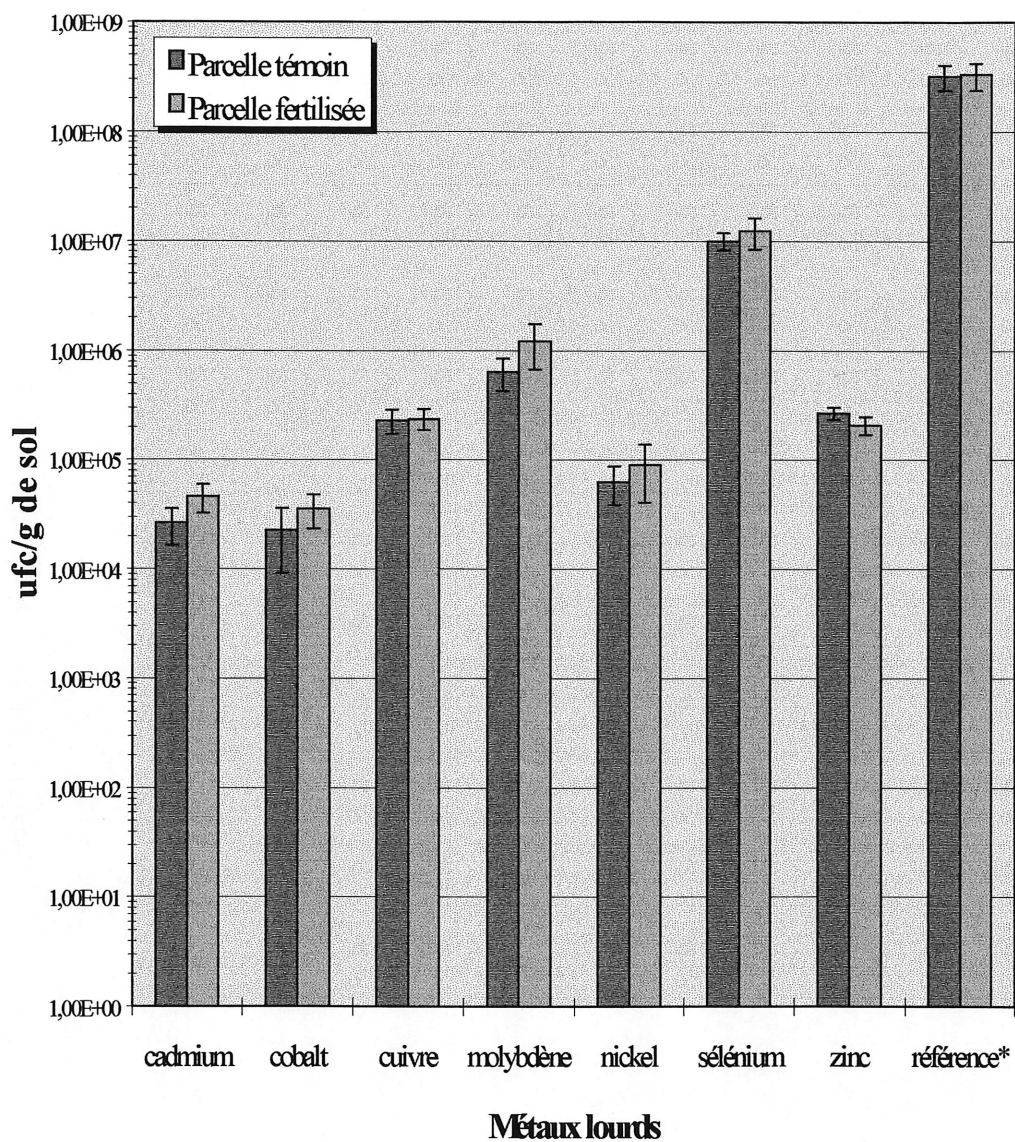




**Figure 5. Dénombrements des bactéries du sol résistantes<sup>1</sup> à sept métaux lourds dans la parcelle fertilisée et la parcelle témoin d'une terre agricole deux ans après son amendement par des boues résiduelles (site Lac Mégantic C, fertilisé en 1992)**

<sup>1</sup> Les bactéries jugées résistantes sont celles qui ont formé des colonies sur les milieux décrits à la section 1.2.3.

\* Le milieu de référence servait aux décomptes des bactéries totales puisqu'il ne contenait aucun métal lourd.

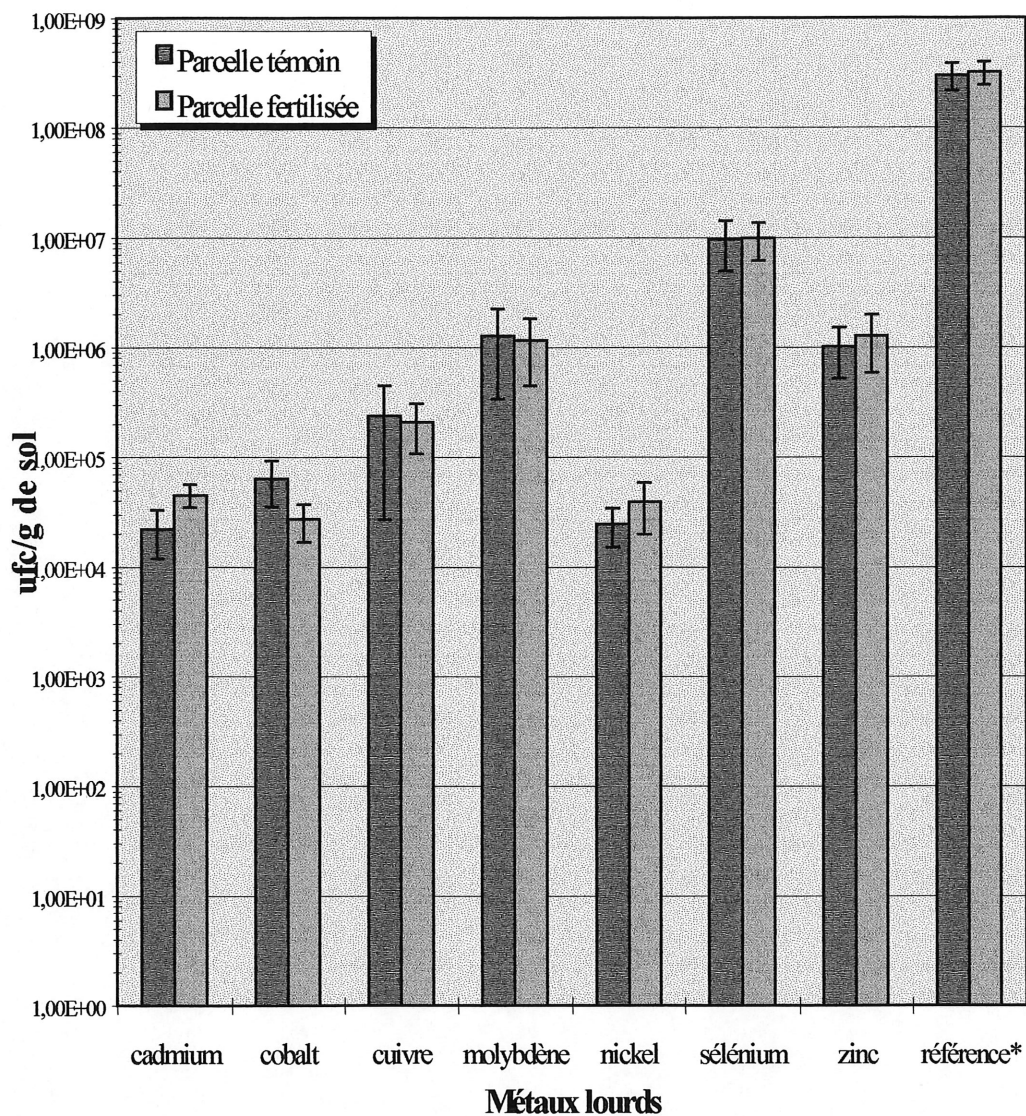


**Figure 6. Dénombrements des bactéries du sol résistantes<sup>1</sup> à sept métaux lourds dans la parcelle fertilisée et la parcelle témoin d'une terre agricole un an après son amendement par des boues résiduaires (site Princeville A, fertilisé en 1993)**

<sup>1</sup> Les bactéries jugées résistantes sont celles qui ont formé des colonies sur les milieux décrits à la section 1.2.3.

\* Le milieu de référence servait aux décomptes des bactéries totales puisqu'il ne contenait aucun métal lourd.





**Figure 7. Dénombrements des bactéries du sol résistantes<sup>1</sup> à sept métaux lourds dans la parcelle fertilisée et la parcelle témoin d'une terre agricole un mois après son amendement par des boues résiduaires (site Princeville B, fertilisé en 1993 et en 1994)**

<sup>1</sup> Les bactéries jugées résistantes sont celles qui ont formé des colonies sur les milieux décrits à la section 1.2.3.

\* Le milieu de référence servait aux décomptes des bactéries totales puisqu'il ne contenait aucun métal lourd.

fertilisées sont rares. Cependant, des différences peuvent être observées dans quelques cas, comme ceux des bactéries résistantes au cadmium dans le sol des sites Lac Mégantic A, B et C (Fig. 3, 4 et 5) ainsi que celui des bactéries du sol résistantes au cobalt du site Princeville B (Fig. 7). Dans chacune de ces situations, la parcelle témoin possédait un taux bactérien équivalent à un peu plus du double de celui de la parcelle fertilisée. Toutefois, si on se base sur les écarts types des décomptes bactériens, ces différences n'étaient pas significatives. Il y a aussi trois cas où c'est le sol des parcelles valorisées qui avait une concentration de bactéries résistantes à un métal lourd supérieure au sol des parcelles témoins. Deux de ces cas se retrouvent à la figure 6, qui illustre les résultats du champs Princeville A, fertilisé un an avant la cueillette d'échantillons. Sur ce site en effet, les bactéries résistantes au cadmium et au molybdène étaient environ deux fois plus nombreuses dans le sol de la parcelle amendée par des boues que dans le sol de la parcelle témoin. La troisième situation où la concentration bactérienne du sol était plus élevée dans la parcelle fertilisée que dans la parcelle non fertilisée était sur le site identifié Princeville B (Fig. 7). Cette hausse d'un peu plus du double fut détectée dans le cas de la résistance des bactéries au cadmium de ce site qui n'avait reçu des boues qu'un mois avant l'échantillonnage. Cependant, comme ce fut le cas pour les quatre premières observations de cette section, ces hausses de concentration bactérienne entre les parcelles traitées et témoins n'étaient pas significatives. Donc, la constatation la plus importante que ces résultats permettent est que, dans les cinq sites sélectionnés, couvrant une période de postfertilisation variant d'un mois à cinq ans, il n'y a eu aucune variation significative dans les concentrations des populations de bactéries totales et dans les concentrations des populations de bactéries résistantes aux sept métaux lourds entre les parcelles fertilisées et les parcelles témoins.

### **2.2.2 La description comparative entre les dénombrements des bactéries résistantes au même métal lourd dans le sol des cinq sites d'étude**

La toute première et la plus importante constatation pouvant être faite lorsque l'on observe les décomptes des populations bactériennes est qu'il n'y a pas eu de différences notables dans la

majorité des taux de bactéries résistantes à un même métal lourd d'un champs à l'autre. Il y a cependant quelques exceptions, comme c'est le cas pour les bactéries résistantes au cadmium des deux champs de la municipalité de Princeville (Fig. 6 et 7). En effet, on remarque dans ces sols que les bactéries étaient en concentrations supérieures, par des facteurs variant de 3X allant même jusqu'à plus de 20X dans certains cas, par rapport à celles qui étaient présentes dans le sol des trois autres terrains de la municipalité de Lac Mégantic (Fig. 3, 4 et 5). Un phénomène semblable fut observable dans les mêmes sols dans le cas des bactéries résistantes au molybdène. Cependant, dans ce cas-ci, les concentrations bactériennes résistantes au molybdène dans les sols des sites Princeville A et B étaient supérieures à celles des trois autres champs à l'étude par des facteurs variant de près de 3X à plus de 12X. On remarque aussi, dans le sol du site Lac Mégantic B (Fig. 4), que les nombres des bactéries résistantes au zinc et au sélénium étaient de beaucoup inférieurs à ceux de certains autres champs. Effectivement, les bactéries du sol du champs Lac Mégantic B résistantes au zinc, qui est le métal lourd amenant le plus de variations dans cette étude, étaient en concentration plus faible que dans les quatre autres sols à l'étude. Cette concentration était plus faible par des facteurs légèrement supérieurs à 3X, comparativement à celle du site Lac Mégantic A (Fig. 3), et allant jusqu'à des facteurs de 18X lorsque comparée à la concentration bactérienne du terrain Princeville B (Fig. 7). En ce qui a trait aux bactéries du sol résistantes au sélénium de ce champs Lac Mégantic B, elles étaient de 3 à 5 fois moins représentées que dans les deux sites de Princeville (Fig. 6 et 7). Par ailleurs, lorsque l'on s'attarde aux concentrations bactériennes mesurées sur les milieux de référence, représentant les bactéries totales ayant poussé sans ajout de métaux lourds et, par conséquent les décomptes les plus élevés, on s'aperçoit que ces concentrations étaient significativement plus basses dans le sol du site Lac Mégantic B que dans le sol des quatre autres sites. En effet, ces concentrations avaient des valeurs d'environ  $7,0 \times 10^7$  ufc/g de sol pour le champs Lac Mégantic B (fig. 4), tandis que pour les sites Lac Mégantic C et A, les taux bactériens respectifs étaient de deux à trois fois plus importants, avec des valeurs frôlant les  $1,4 \times 10^8$  ufc/g de sol pour le terrain Lac Mégantic C (fig. 5), et allant jusqu'à  $2,3 \times 10^8$  ufc/g de sol dans les parcelles du site Lac Mégantic A (fig. 3). Finalement, ce sont les sols de la municipalité de Princeville (fig. 6 et



7), qui possédaient les concentrations de bactéries totales les plus élevées avec des dénombrements surpassant les  $3,0 \times 10^8$ ; ces valeurs étaient donc plus de quatre fois supérieures à celles du site Lac Mégantic B.

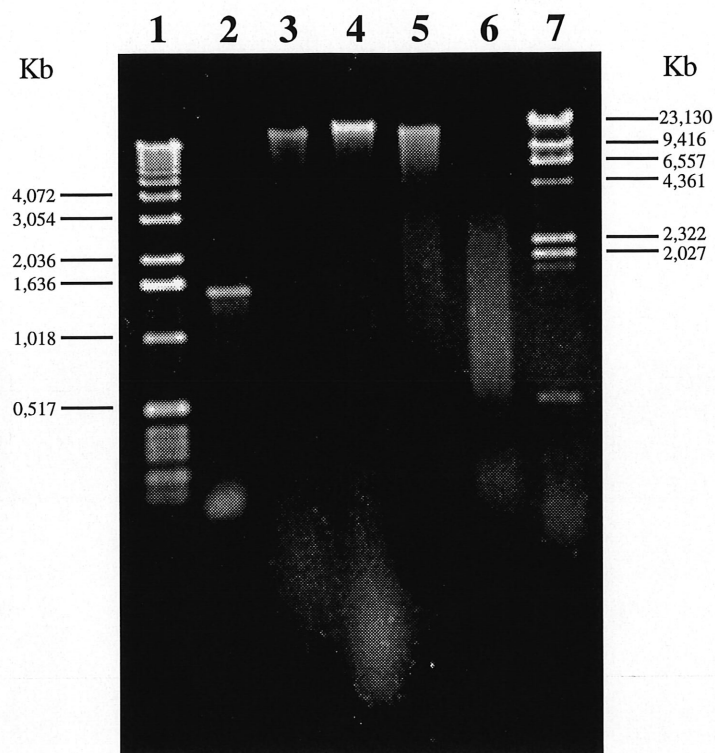
### **2.3 Le développement d'une technique efficace de détection microbienne pour des sols ayant reçu un épandage de boues résiduaires, la vérification de la présence possible de coliformes dans des sols amendés et la différenciation de certaines espèces bactériennes du genre *Streptomyces* (description des résultats du volet 3)**

#### **2.3.1 Résultats obtenus des cinq protocoles d'extraction de l'ADN des microorganismes du sol expérimentés**

L'extraction de l'ADN des microorganismes du sol était la première étape à considérer pour l'élaboration de la technique de détection microbienne. Pour sélectionner un protocole efficace et adéquat, cinq protocoles ont été expérimentés dans le cadre de ces travaux.

Les cinq méthodes utilisées pour isoler l'ADN des microorganismes du sol ont produit des extraits bruts d'ADN contenant beaucoup de substances humiques, comme en témoignait leur couleur brunâtre. En effet, tous les extraits, à l'exception de celui obtenu grâce à la technique de Trevors *et al.* (1992), étaient des mixtures de couleurs allant du brun foncé au brun noirâtre quasiment opaque. Quant à l'extrait provenant du protocole de Trevors *et al.* (1992), il arborait, contrairement aux autres, une robe plus pâle, se rapprochant plus du beige que du brun.

On peut visualiser l'ADN extrait des microorganismes du sol par les différents protocoles sur la photographie du gel d'agarose illustrée à la figure 8. À l'aide de cette figure, il est possible de déterminer quel protocole est le plus efficace. Pour ce faire, il s'agit de comparer les cinq extraits bruts d'ADN pour voir s'ils diffèrent les uns des autres, soit par leur concentration en ADN, ou encore par la taille des fragments d'ADN qu'ils contiennent. Comparons d'abord la



**Figure 8. Électrophorèse des extraits d'ADN des microorganismes du sol obtenus par cinq différents protocoles**

- 1: Marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 1 Kb)
- 2: ADN des microorganismes du sol obtenu grâce à la méthode de Steffan et Atlas (1988)
- 3: ADN des microorganismes du sol obtenu grâce à la méthode de Bruce *et al.* (1992)
- 4: ADN des microorganismes du sol obtenu grâce à la méthode de Tsai et Olson (1991)
- 5: ADN des microorganismes du sol obtenu grâce à la méthode de Trevors *et al.* (1992)
- 6: ADN des microorganismes du sol obtenu grâce à la méthode de Volossiuk *et al.* (1988)
- 7: Marqueur de poids moléculaire (1 µg d'ADN de  $\lambda$  digéré par l'endonucléase *Hind*III)

\* Il est à noter que les fractions des extraits d'ADN ayant migré sur le gel correspondaient toutes à une quantité d'ADN provenant de 40 mg de sol, sauf dans le cas du protocole de Steffan et Atlas (puits 2) où la fraction migratoire, qui était dix fois plus importante que celle des autres protocoles, correspondait à 400 mg de sol.

taille des brins d'ADN des microorganismes du sol provenant des divers protocoles. La première constatation qu'il a été possible d'effectuer, c'est que l'ADN obtenu en suivant la méthode de Tsai et Olson (1991) comprenait les plus gros fragments. En effet, la majeure partie de l'ADN extrait par ce protocole avait une taille d'environ 23 Kb. Les techniques d'extraction d'ADN de Bruce *et al.* (1992) et de Trevors *et al.* (1992) ont aussi mené à l'obtention de brins d'ADN de grande taille, avec des fragments d'ADN surtout situés au-dessus de la barre des 9,4 Kb. Les deux protocoles qui ferment la marche avec l'ADN le plus fragmenté sont les protocoles de Volossiuk *et al.* (1995), avec de l'ADN d'une taille surtout comprise entre 3 et 0,5 Kb, et de Steffan et Atlas (1988), dont la plupart des fragments d'ADN isolés étaient d'environ 1,5 Kb.

L'autre type de comparaisons intéressantes pouvant être effectué grâce à la photographie représentée à la figure 8 se situe au niveau de la concentration en ADN des différents extraits. En effet, comme la concentration des échantillons de l'électrophorèse est en rapport direct avec la quantité totale d'ADN obtenue par les méthodes d'extraction expérimentées, il est possible d'évaluer les rendements respectifs de chacune d'entre elles. Il est important de mentionner qu'étant donné que la quantification des concentrations d'ADN était déterminée par une comparaison entre l'intensité des bandes des extraits d'ADN avec celles du marqueur de poids moléculaire d'ADN de lambda digéré par *HindIII*, les rendements ainsi déterminés sont approximatifs et ils ne servent qu'à déterminer un ordre de grandeur. Cet ordre de grandeur est assez évident sur la photographie de l'électrophorèse (fig. 8) puisque le volume des fractions déposées sur le gel était calculé de façon à ce que chacun des extraits représente l'ADN provenant d'une quantité identique de sol, ceci dans le but de faciliter la comparaison entre eux. Il y a cependant une exception, dans le cas du protocole de Steffan et Atlas (1988) (fig. 8, puits 2), où la fraction migratoire provenait d'une quantité de sol dix fois plus importante que celle des quatre autres extraits. Par conséquent, si la fraction de l'extrait d'ADN déposée sur le gel avait été la même que dans les quatre autres cas, l'ADN visualisé dans ce puits de migration aurait été visible en intensité dix fois moindre que celui observé présentement. Lorsque l'on compare



l'intensité des cinq extraits d'ADN de la figure 8, un des premiers constats pouvant être fait est que le protocole de Tsai et Olson (1991) figure encore en tête de file. En effet, ce protocole est celui qui semble le plus efficace, avec un rendement obtenu d'environ 12 µg d'ADN/g de sol. Il est suivi par la technique de Trevors *et al.* (1992), avec la démonstration d'un rendement approximatif de 8 à 9 µg d'ADN/g de sol, et de Bruce *et al.* (1992) qui a permis l'isolement d'environ 4 à 6 µg d'ADN/g de sol. Quant à la méthode proposée par Volossiuk *et al.* (1995), qui a la concentration la plus difficile à évaluer étant donné la présence d'une traînée («smear») sans bande distincte sur la photographie, elle a démontré un rendement côtoyant les 3 µg d'ADN/g de sol. Finalement, c'est la technique d'extraction indirecte de Steffan et Atlas qui a mené à l'extraction de la plus faible quantité d'ADN des microorganismes du sol, avec un taux d'à peu près 0,7 à 1 µg d'ADN/g de sol.

### **2.3.2 Résultats obtenus des trois méthodes utilisées pour purifier les extraits bruts d'ADN isolés des microorganismes du sol**

La deuxième étape de ce volet de la recherche visait à purifier adéquatement l'ADN microbien obtenu pour permettre son amplification par PCR. Trois méthodes de purification, dont une extraction par solvants et deux autres par chromatographie, ont donc été combinées et expérimentées sur les extraits d'ADN des microorganismes du sol obtenus des deux protocoles les plus prometteurs, soit celui de Tsai et Olson (1991) et celui de Trevors *et al.* (1992).

La constatation majeure qui résulte de ce processus de purification est que les extraits d'ADN des microorganismes du sol ayant subi cette triple purification ont perdu leur couleur brunâtre et sont devenus d'apparence claire et limpide. En effet, déjà après l'étape d'extraction par le phénol et le chloroforme, bon nombre de contaminants avaient été éliminés, comme en font foi les couleurs des échantillons qui avaient perdu beaucoup de leur intensité. Toutefois, c'est pendant la chromatographie sur colonne de Sephadex G-200 que les extraits d'ADN semblent

avoir été le plus purifiés. Effectivement, les extraits d'ADN ayant passé à travers des colonnes de Sephadex G-200 ont laissé la quasi-totalité de leurs particules contaminantes de couleur dans la colonne. Les filtrats obtenus après cette étape étaient devenus clairs ou arboraient une légère teinte jaune pâle. Ces quelques rares échantillons, légèrement teintés, provenaient tous d'extraits obtenus par la méthode proposée par Tsai et Olson (1991). Quant à eux, les filtrats des extraits produits par le protocole de Trevors *et al.* (1992), qui présentaient après l'extraction une couleur déjà beaucoup plus pâle que tous les autres, étaient tous devenus limpides. Finalement, c'est la deuxième étape de purification par chromatographie, soit celle comportant une matrice de Chelex-100, qui se devait de compléter la purification. Par suite du passage des échantillons dans ces colonnes, aucun d'entre eux ne contenait des particules contaminantes apparentes. Il est donc très probable que les échantillons purifiés par cette triple combinaison aient été débarrassés des substances humiques ainsi que des autres impuretés qu'ils contenaient. C'est cependant grâce aux essais d'amplification par PCR, dont les résultats sont décrits à la section 2.3.3.1, que l'efficacité des purifications a été vérifiée. Parallèlement, une comparaison a été effectuée entre l'efficacité d'amplification de certains échantillons ayant subi les trois purifications et de d'autres échantillons n'ayant pas été purifiés sur colonne de Chelex-100 et ce, sur des extraits d'ADN provenant de sols valorisés et non valorisés.

### **2.3.3 Résultats de détections et de différenciations de microorganismes par la PCR**

#### **2.3.3.1 Résultats concernant la détermination du seuil minimal de détection et la validité de la technique de détection microbienne développée**

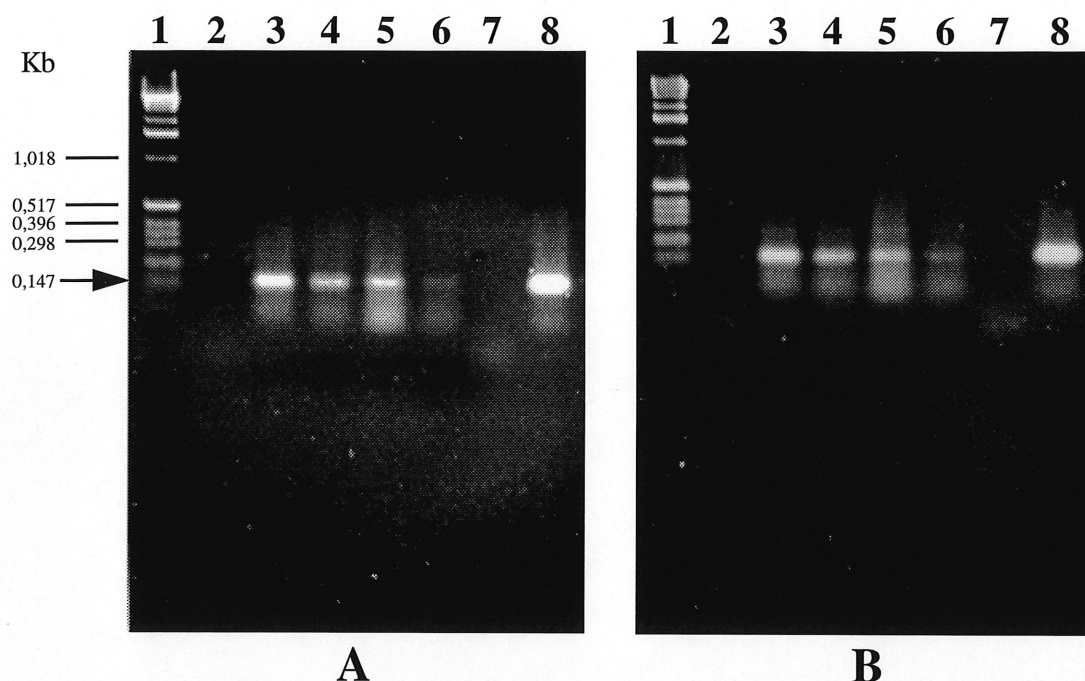
Pour déterminer si la technique de détection de microorganismes mise au point était adéquate et à quel point elle était efficace, plusieurs essais d'amplification par PCR ont été exécutés. Ces expériences ont été menées à l'aide des amorces UAL-754 et UAR-900 (voir sections 1.3.7.1 et 1.3.7.2.1) sur l'ADN des microorganismes du sol obtenu par les protocoles de Tsai et Olson



(1991) et de Trevors *et al.* (1992). Les sols amendés et non amendés utilisés dans cette partie de l'étude avaient été inoculés par des cellules cibles d'*Escherichia coli* JM 109 (voir section 1.3.2).

En premier lieu, des essais de PCR ont été réalisés sur des extraits d'ADN microbien provenant de sols non amendés par des boues résiduaire. Ces expériences visaient à comparer l'efficacité de détection microbienne générée par des extraits d'ADN obtenus par le protocole de Tsai et Olson (1991), par rapport à celle générée par des extraits d'ADN obtenus par le protocole de Trevors *et al.* (1992). De plus, dans les deux cas, des amplifications ont été effectuées sur des extraits d'ADN ayant subi les trois purifications proposées et sur d'autres extraits d'ADN qui n'avaient pas été purifiés sur colonne de Chelex-100. Les résultats de ces amplifications par PCR sont illustrés aux figures 9 et 10. Ces figures indiquent, premièrement, qu'avec les amorces utilisées, un résultat d'amplification positif était représenté par l'apparition d'une bande unique de 147 pb et, plus le nombre de cellules cibles présentes dans l'échantillon était grand, plus cette bande était importante. On remarque aussi, en comparant les photographies A et B des figures 9 et 10, qu'il n'y a pas de différence entre l'efficacité d'amplification générée par les extraits obtenus des deux techniques d'extraction microbienne. En effet, le seuil minimal de détection microbienne ne différait pas selon que l'ADN ait été obtenu par la méthode de Tsai et Olson (1991) ou par la méthode de Trevors *et al.* (1992). Ce seuil minimal de détection microbienne était aussi le même entre les échantillons ayant traversé complètement la triple purification (fig. 10) et les échantillons n'ayant pas subi la purification supplémentaire sur Chelex-100 (fig. 9). Effectivement, dans un cas comme dans l'autre, et peu importe lequel des deux protocoles d'extraction d'ADN était utilisé, la densité minimale qui permettait une détection microbienne était de 500 cellules d'*E. coli*/g de sol.

Dans un deuxième temps, des expériences d'amplification par PCR ont été réalisées sur des extraits d'ADN microbien provenant de sols amendés par trois différentes doses de boues résiduaire (voir section 1.1.2). Ces expériences visaient à comparer l'efficacité de détection

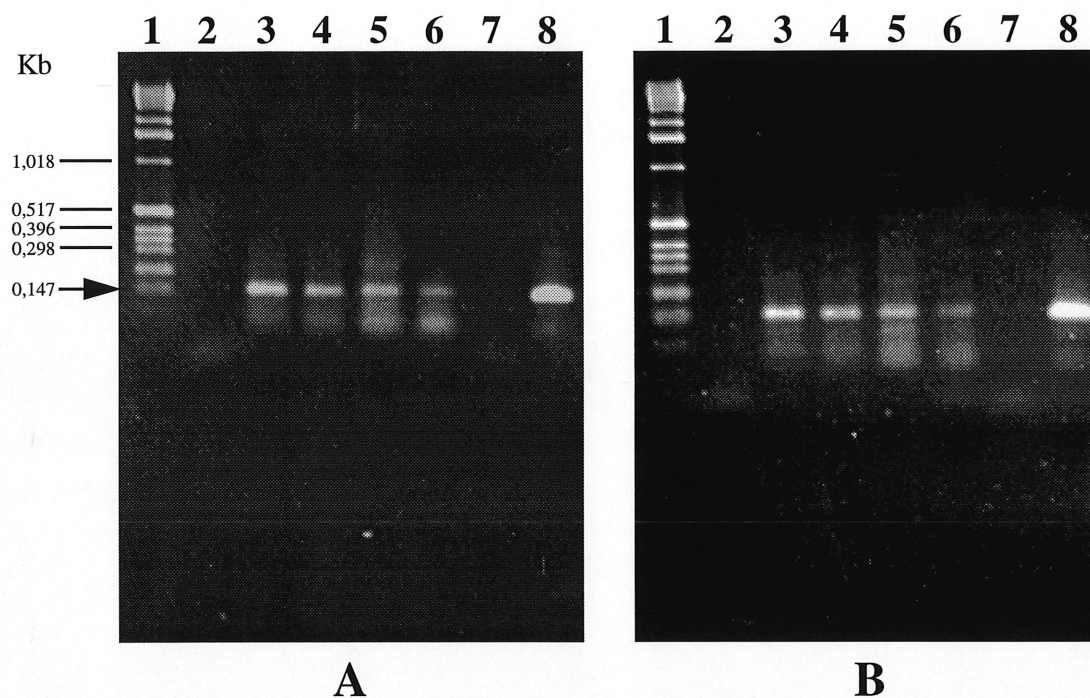


**Figure 9. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces UAL-754 et UAR-900 sur des extraits d'ADN microbien, non purifiés par Chelex-100, qui provenaient d'un sol non amendé par des boues résiduaires et inoculé par des cellules cibles**

Gel A: ADN microbien extrait du sol par le protocole de Tsai et Olson (1991)

Gel B: ADN microbien extrait du sol par le protocole de Trevors *et al.* (1992)

- 1: Marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 1 Kb)
- 2: Témoin négatif - ADN microbien extrait d'un sol non inoculé avec des cellules d'*E. coli*
- 3: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 100 000 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 4: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 10000 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 5: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 1000 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 6: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 500 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 7: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 250 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 8: Témoin positif - produit d'amplification obtenu à partir d'1 µg d'ADN de *E. coli* JM 109



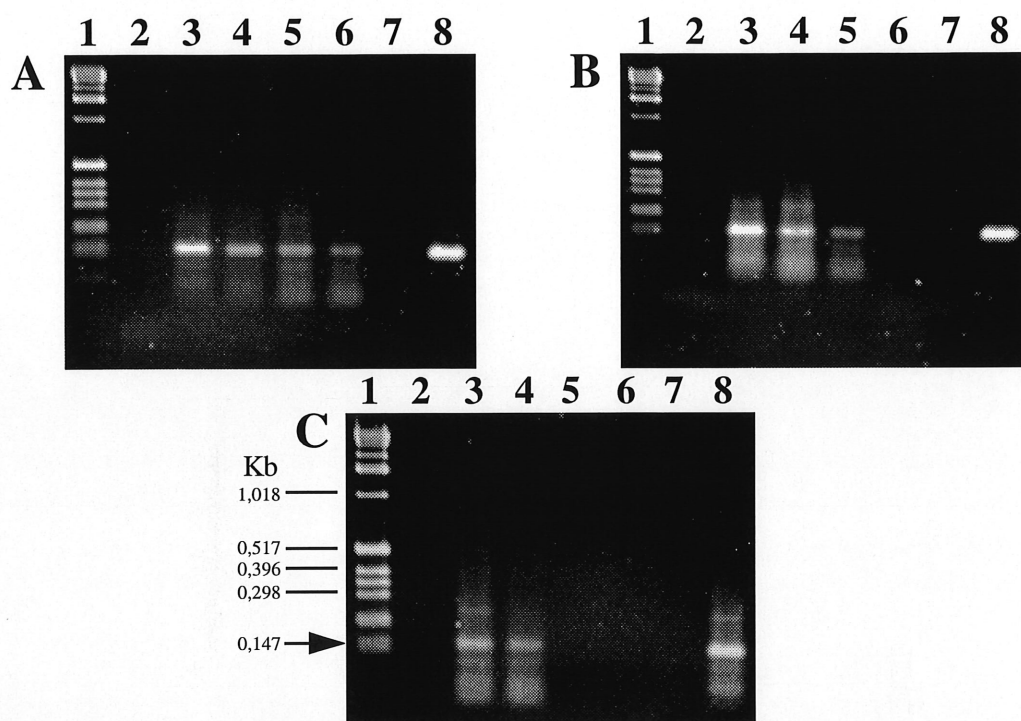
**Figure 10. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces UAL-754 et UAR-900 sur des extraits d'ADN microbien, purifiés par Chelex-100, qui provenaient d'un sol non amendé par des boues résiduelles et inoculé par des cellules cibles**

Gel A: ADN microbien extrait du sol par le protocole de Tsai et Olson (1991)

Gel B: ADN microbien extrait du sol par le protocole de Trevors *et al.* (1992)

- 1: Marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 1 Kb)
- 2: Témoin négatif - ADN microbien extrait d'un sol non inoculé avec des cellules d'*E. coli*
- 3: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 100 000 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 4: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 10000 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 5: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 1000 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 6: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 500 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 7: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 250 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 8: Témoin positif - produit d'amplification obtenu à partir d'1 µg d'ADN de *E. coli* JM 109





**Figure 11. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces UAL-754 et UAR-900 sur des extraits d'ADN microbien\*, non purifiés sur colonne de Chelex-100, qui provenaient de sols différemment amendés par des boues résiduelles et inoculés par des cellules cibles**

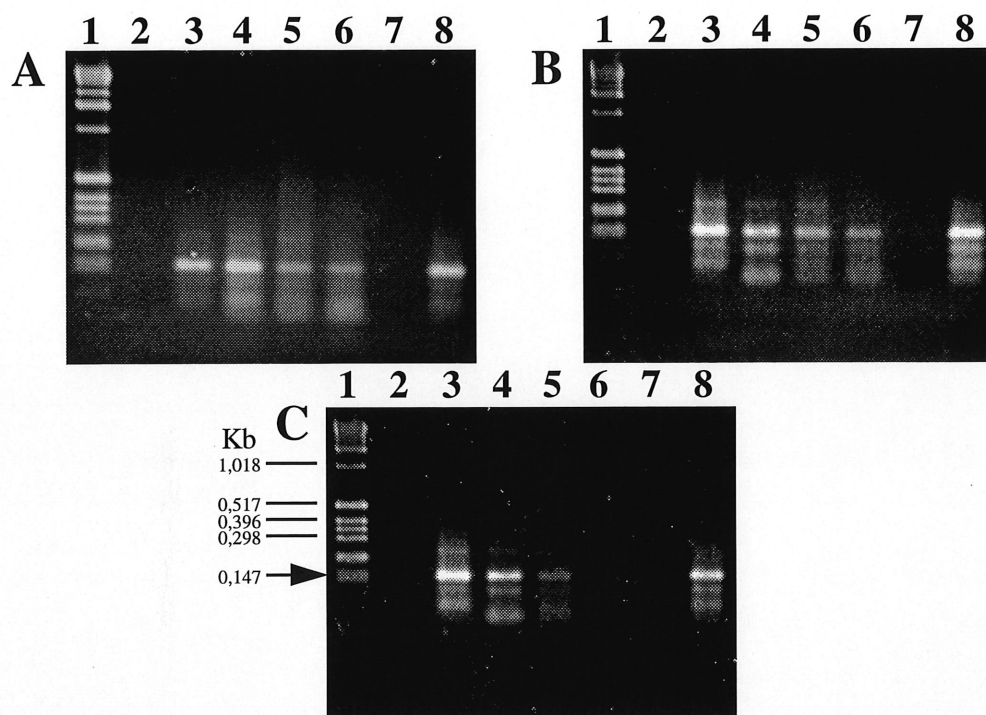
Gel A: ADN isolé d'un sol ayant reçu des boues représentant 25% de la dose maximale

Gel B: ADN isolé d'un sol ayant reçu des boues représentant 100% de la dose maximale

Gel C: ADN isolé d'un sol ayant reçu des boues représentant 120% de la dose maximale

- 1: Marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 1 Kb)
- 2: Témoin négatif - ADN microbien extrait d'un sol non inoculé avec des cellules d'*E. coli*
- 3: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 100 000 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 4: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 10000 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 5: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 1000 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 6: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 500 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 7: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 250 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 8: Témoin positif - produit d'amplification obtenu à partir d'1 µg d'ADN de *E. coli* JM 109

\* Les extraits d'ADN microbien de ces expériences ont été obtenus par le protocole de Trevors *et al.* ( 1992).



**Figure 12. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces UAL-754 et UAR-900 sur des extraits d'ADN microbien\*, purifiés sur colonne de Chelex-100, qui provenaient de sols différemment amendés par des boues résiduelles et inoculés par des cellules cibles**

Gel A: ADN isolé d'un sol ayant reçu des boues représentant 25% de la dose maximale

Gel B: ADN isolé d'un sol ayant reçu des boues représentant 100% de la dose maximale

Gel C: ADN isolé d'un sol ayant reçu des boues représentant 120% de la dose maximale

- 1: Marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 1 Kb)
- 2: Témoin négatif - ADN microbien extrait d'un sol non inoculé avec des cellules d'*E. coli*
- 3: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 100 000 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 4: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 10000 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 5: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 1000 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 6: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 500 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 7: ADN microbien extrait d'un sol ayant été inoculé avec 250 cellules d'*E. coli*/g de sol
- 8: Témoin positif - produit d'amplification obtenu à partir d'1 µg d'ADN de *E. coli* JM 109

\* Les extraits d'ADN microbien de ces expériences ont été obtenus par le protocole de Trevors *et al.* ( 1992).

microbienne générée par des extraits d'ADN obtenus de ces différents sols et ce, après avoir subi soit une purification sans chromatographie sur colonne de Chelex-100, soit une purification complète. On retrouve donc, sur les photographies des figures 11 et 12, la bande de 0,147 Kb représentant la confirmation d'une amplification par PCR et qui est, encore ici, variable en importance selon le nombre de cellules cibles inoculées dans le sol. Il est aussi possible de constater sur ces figures que les seuils minimaux de détection microbienne diffèrent selon la quantité de boues ajoutée sur le sol de provenance de l'extrait d'ADN. En effet, plus la quantité de boues ajoutée sur le sol était considérable, moins la technique de détection était sensible et plus le seuil minimum de détection microbienne était élevé. Toutefois, l'étape de purification sur colonne de Chelex-100 a augmenté significativement l'efficacité des détections microbiennes comme en témoigne la figure 12, où les seuils minimaux de détection sont plus bas qu'à la figure 11, sur laquelle les extraits d'ADN microbien n'avaient pas été purifiés par ce type de chromatographie. Il n'y a que le seuil minimal de détection microbienne de l'extrait d'ADN provenant du sol n'ayant reçu que 25% de la dose de boues maximale permise (fig. 11-A et 12-A) qui est resté le même, soit de 500 cellules d'*E. coli*/g de sol. Quant aux autres seuils minimaux de détection, par suite de la purification sur Chelex-100, ils sont passés de 1000 à 500 cellules d'*E. coli*/g de sol, dans le cas de l'ADN microbien isolé du sol ayant reçu une quantité de boues équivalent à 100% de la dose maximale permise (fig. 11-B et 12-B), et de 10000 à 1000 cellules d'*E. coli*/g de sol, dans le cas de l'isolat provenant du sol amendé avec une quantité de boues représentant 120% de la dose maximale permise (fig. 11-C et 12-C).

#### **2.3.3.2 Résultats concernant la vérification de la présence possible de coliformes dans les sols amendés par des boues résiduelles**

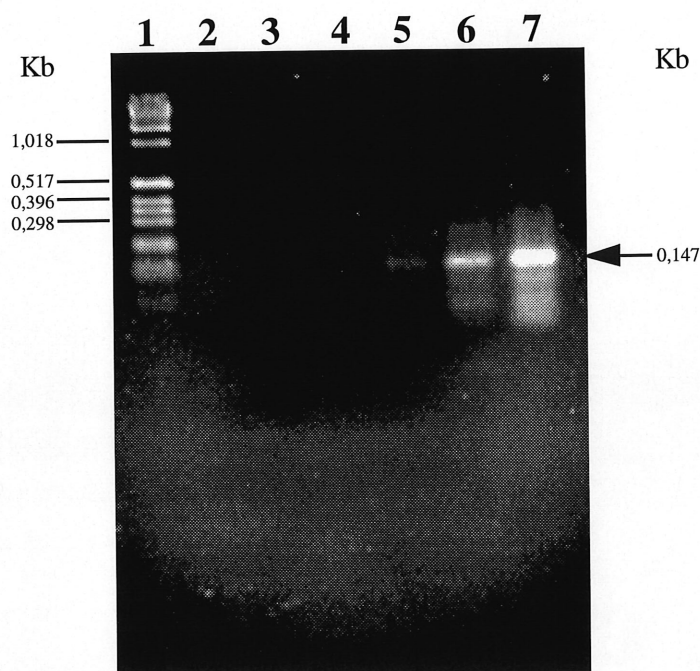
Pour déterminer si des coliformes sont toujours présents dans le sol après un amendement de boues résiduelles, des essais d'amplification par PCR ont été effectués sur de l'ADN extrait des microorganismes de quatre sols différemment amendés (voir section 1.3.1) et ce, six mois après

que les amendements aient été effectués. Ces extraits d'ADN, qui ont été amplifiés par PCR grâce aux amorces UAL-754 et UAR-900, avaient préalablement subi la triple purification détaillée à la section 1.3.6. Les résultats de ces amplifications sont représentés par le gel d'agarose illustré à la figure 13. Sur cette photographie, il est possible de visualiser, dans les puits 5 et 6, une bande de 147 pb confirmant une détection positive. Ces puits représentent des échantillons d'extraits d'ADN microbien provenant de sols ayant reçu des quantités de boues respectives équivalentes à 100% et à 120% de la dose maximale permise (MENVIQ, 1991b). En effet, des détections positives de coliformes ont été réalisées dans les deux sols ayant reçu les plus importants amendements de boues résiduaires, contrairement au sol qui n'a été amendé que par une quantité de boues représentant 25% de la dose maximale permise, où aucune bande ne peut être visualisée. Finalement, on peut remarquer que la bande amplifiée par PCR est très faible et beaucoup moins importante dans le cas de l'extrait d'ADN provenant du sol amendé par la quantité maximale de boues permise que dans le cas de l'extrait d'ADN microbien isolé du sol ayant reçu la quantité de boues qui dépassait de 20% la norme réglementaire.

### **2.3.3.3 Résultats concernant la détection et la différenciation de certaines bactéries du genre *Streptomyces***

Des amplifications par PCR ont été réalisées sur de l'ADN génomique de différentes souches de *S. scabies* et de *S. caviscabies* ainsi que sur de l'ADN extrait des microorganismes du sol par les protocoles de Tsai et Olson (1991) et de Trevors *et al.* (1992). Ces expériences de PCR poursuivaient deux objectifs. Le premier visait à déterminer si, grâce aux amorces pA et pH\* ainsi que MSTM-1L et MSTM-2C, une différenciation par PCR pouvait être effectuée entre les souches de *Streptomyces* étudiées. Le deuxième objectif consistait à vérifier s'il était possible, à l'aide des mêmes paires d'amorces, de faire des détections de bactéries du genre *Streptomyces* dans le sol.





**Figure 13. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces UAL-754 et UAR-900 sur de l'ADN microbien extrait, par le protocole de Trevors *et al.* (1992)\*, de sols différemment amendés par des boues résiduelles**

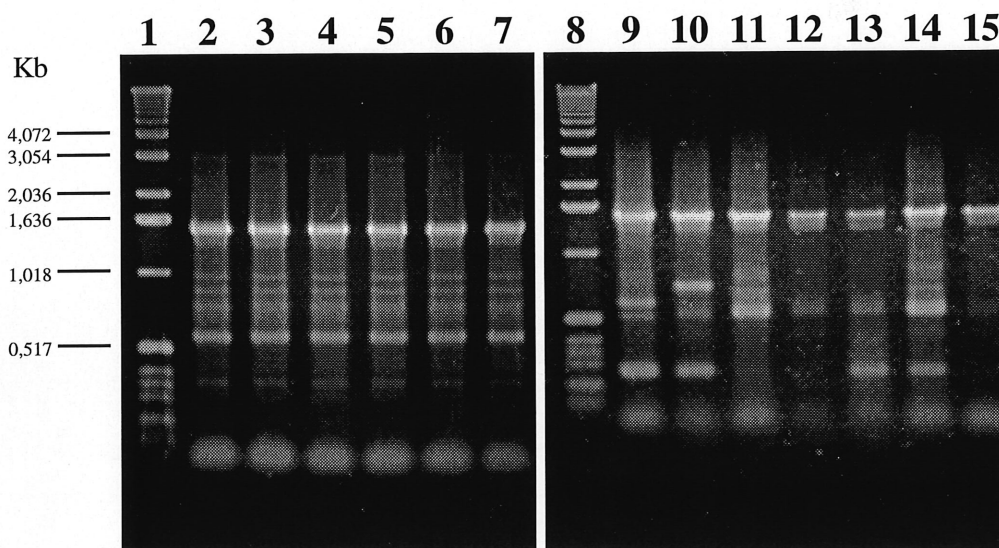
- 1: Marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 1 Kb)
- 2: Témoin négatif - Réaction de PCR en absence d'ADN microbien
- 3: ADN microbien extrait d'un sol n'ayant pas reçu de boues résiduelles
- 4: ADN isolé d'un sol ayant reçu des boues représentant 25% de la dose maximale permise
- 5: ADN isolé d'un sol ayant reçu des boues représentant 100% de la dose maximale permise
- 6: ADN isolé d'un sol ayant reçu des boues représentant 120% de la dose maximale permise
- 7: Témoin positif - produit d'amplification obtenu à partir d'1 µg d'ADN de *E. coli* JM 109

\* L'ADN fut extrait des microorganismes des sols six mois après les amendements de ceux-ci avec des boues résiduelles.



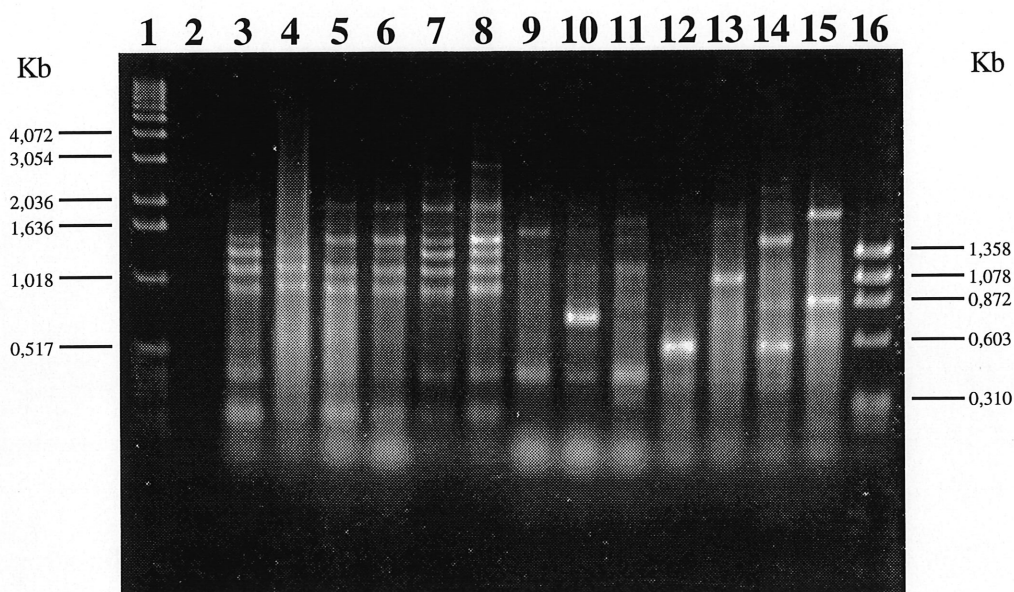
Avant d'analyser les résultats, il est à noter que, pour vérifier la reproductibilité du système de détection, toutes les expériences de différenciation par PCR ont été répétées deux fois ou plus. Les produits de PCR obtenus par les réactions subséquentes étaient toujours presque identiques aux fragments visualisés à la suite de la première réaction. Cela indique que les patrons d'amplification générés lors de ces travaux sont reproductibles. Les résultats des amplifications par PCR réalisées avec les amorces pA et pH\* sur l'ADN des souches bactériennes du genre *Streptomyces* sont illustrés à la figure 14. Ces résultats démontrent premièrement que des amplifications ont eu lieu avec les 13 extraits d'ADN génomique et que, dans chacun des cas, le produit de PCR de loin le plus dominant est représenté par une bande de 1,53 Kb. De plus, l'électrophorèse permet de distinguer un ou quelques autres petits fragments dans tous les puits de migration. Mis à part les faibles traînées («smear») représentant des polymérisations prolongées ou partielles, ces produits secondaires étaient d'une taille plus petite que le fragment d'amplification principal de 1,53 Kb et, dans chaque cas, un fragment de 0,55 Kb d'intensité plus ou moins forte était présent. On peut remarquer que tous les extraits d'ADN de *S. caviscabies* ont mené aux mêmes produits d'amplification par PCR (fig. 14, puits 2 à 7). Pour ce qui est des patrons d'amplification des souches de *S. scabies* (fig. 14, puits 9 à 15), quoique très semblables, ils diffèrent légèrement de l'un à l'autre. Ces résultats permettent donc d'affirmer que les patrons d'amplification, réalisés avec les amorces pA et pH\* sur l'ADN des extraits d'ADN génomique de différentes souches de *Streptomyces*, sont identiques, comme c'est le cas pour toutes les souches de *S. caviscabies*, ou ne comportent que quelques différences mineures entre eux.

Les résultats illustrés à la figure 15 concernent aussi les expériences de différenciation bactérienne de *Streptomyces* mais, cette fois-ci, les amplifications avaient été réalisées avec les amorces MSTM-1L et MSTM-2C. La photographie du gel d'électrophorèse démontre bien que cette paire d'amorces a mené à la formation de plusieurs produits de PCR différents. On remarque toutefois que les résultats d'amplification de l'ADN des six souches de *S. caviscabies*,



**Figure 14. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces pA et pH\* sur de l'ADN génomique de plusieurs souches bactériennes des espèces *S. scabiei* et *S. caviabies***

- 1: Marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 1 Kb)
- 2: ADN génomique de *S. caviabies* EF-83
- 3: ADN génomique de *S. caviabies* EF-86
- 4: ADN génomique de *S. caviabies* EF-87
- 5: ADN génomique de *S. caviabies* EF-88
- 6: ADN génomique de *S. caviabies* EF-92
- 7: ADN génomique de *S. caviabies* EF-95
- 8: Marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 1 Kb)
- 9: ADN génomique de *S. scabiei* EF-35
- 10: ADN génomique de *S. scabiei* R90-8
- 11: ADN génomique de *S. scabiei* EF-46
- 12: ADN génomique de *S. scabiei* EF-54
- 13: ADN génomique de *S. scabiei* EF-56
- 14: ADN génomique de *S. scabiei* C-1
- 15: ADN génomique de *S. scabiei* C-6



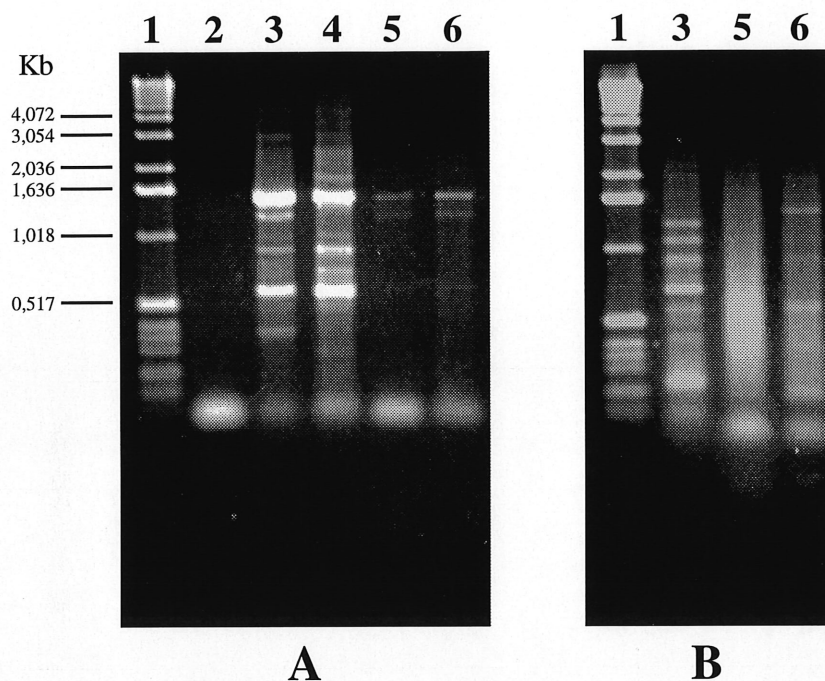
**Figure 15. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée avec les amorces MSTM-1L et MSTM-2C sur de l'ADN génomique de plusieurs souches bactériennes des espèces *S. scabies* et *S. cavigabies***

- 1: Marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 1 Kb)
- 2: Témoin négatif - Réaction de PCR en absence d'ADN bactérien
- 3: ADN génomique de *S. cavigabies* EF-83
- 4: ADN génomique de *S. cavigabies* EF-86
- 5: ADN génomique de *S. cavigabies* EF-87
- 6: ADN génomique de *S. cavigabies* EF-88
- 7: ADN génomique de *S. cavigabies* EF-92
- 8: ADN génomique de *S. cavigabies* EF-95
- 9: ADN génomique de *S. scabies* EF-35
- 10: ADN génomique de *S. scabies* R90-8
- 11: ADN génomique de *S. scabies* EF-46
- 12: ADN génomique de *S. scabies* EF-54
- 13: ADN génomique de *S. scabies* EF-56
- 14: ADN génomique de *S. scabies* C-1
- 15: ADN génomique de *S. scabies* C-6
- 16: Marqueur de poids moléculaire (0,5 μg d'ADN de ΦX-174 RF digéré par *Hae*-III)



dont les bandes importantes se situent entre 0,9 et 1,4 Kb, sont pratiquement les mêmes. En effet, même si l'intensité des fragments d'ADN varie d'un cas à l'autre et que quelques traînées («smear») plus ou moins grandes sont présentes dans certains puits (exemple fig. 15, puits 4), les patrons produits par l'amplification de l'ADN des souches de *S. caviscabies* sont identiques. Toutefois, dans quelques rares expériences de différenciation de *S. caviscabies* par PCR, la bande de 1,4 Kb était absente et une autre bande de poids moléculaire moindre que 0,9 Kb pouvait apparaître (exemple puits 3, fig. 16 B). Cependant, lorsque cela se produisait, ces légères modifications étaient présentes dans les résultats d'amplification des extraits d'ADN de chaque souche de *S. caviscabies*, de sorte que leurs patrons d'amplification restaient tout de même identiques. La constatation est tout autre en ce qui a trait aux produits de PCR générés par les extraits d'ADN génomique des souches de *S. scabies*. Effectivement, la figure 15 nous démontre que les patrons d'amplification de ces extraits d'ADN sont différents les uns des autres et que aucun d'entre eux ne ressemble aux patrons produits par les souches de *S. caviscabies*. On peut aussi remarquer que les extraits d'ADN des souches de *S. scabies* menaient à des produits d'amplification où il n'y avait qu'une ou deux bandes majoritaires, comparativement à quatre dans le cas de l'amplification de l'ADN extrait des souches de *S. caviscabies*. En résumé, mentionnons que les résultats représentés à la figure 15 démontrent que les patrons d'amplification, obtenus à l'aide des amorces MSTM-1L et MSTM-2C, sont identiques et très caractéristiques pour les souches de *S. caviscabies*, alors qu'ils montrent de nettes différences lorsque comparés avec les patrons des souches de *S. scabies*, ceux-ci étant distincts les uns des autres.

La troisième et dernière partie de cette section concerne les détections de bactéries du genre *Streptomyces* présentes dans le sol. Les résultats de ces expériences sont illustrés à la figure 16. Ces photographies permettent de constater que les deux protocoles d'extraction d'ADN des microorganismes du sol ont produit des extraits pouvant être amplifiés efficacement avec les deux paires d'amorces étudiées (puits 5 et 6, fig. 16-A et 16-B). Les résultats des réactions de



**Figure 16. Électrophorèse des produits d'une amplification par PCR réalisée sur de l'ADN génomique de certaines bactéries des espèces *S. scabies* et *S. caviscabies* ainsi que sur de l'ADN extrait des microorganismes du sol**

Gel A: Amplification par PCR réalisée à l'aide des amorces pA et pH\*

Gel B: Amplification par PCR réalisée à l'aide des amorces MSTM-1L et MSTM-2C

- 1: Marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 1 Kb)
- 2: Témoin négatif - Réaction de PCR en absence d'ADN bactérien
- 3: ADN génomique de *S. caviscabies* EF-88
- 4: ADN génomique de *S. scabies* EF-46
- 5: ADN microbien extrait du sol par le protocole de Trevors *et al.* (1992)
- 6: ADN microbien extrait du sol par le protocole de Tsai et Olson (1991)

PCR sont toutefois différents selon la paire d'amorces utilisée. Dans le cas des amplifications réalisées à l'aide des amorces pA et pH\*, une petite bande de 1,1 Kb et une bande dominante de 1,53 Kb confirment la présence de cellules cibles dans le sol (puits 5 et 6, fig. 16-A). En effet, la bande de 1,53 Kb représente un signal positif de détection bactérienne qui correspond exactement au fragment principal résultant de l'amplification de l'ADN génomique des souches de *S. caviscabies* et de *S. scabies* (puits 3 et 4, fig. 16-A). La faible bande de 1,1 Kb pourrait, tout comme celle de 1,53 Kb, être attribuable à la détection de bactéries du genre *Streptomyces*, puisqu'elle semble être identique à une bande de même taille présente dans le patron d'amplification de l'ADN génomique de *S. caviscabies* (puits 3, fig. 16-A). Toutefois, les autres bandes de poids moléculaire inférieur à 1,0 Kb, faisant partie des patrons d'amplification d'ADN génomique de *S. scabies* et de *S. caviscabies* (puits 3 et 4, fig. 16-A), sont absentes des produits d'amplification générés par les extraits d'ADN des microorganismes du sol. On peut également remarquer, sur la photographie A de la figure 16, que les produits obtenus par l'amplification des extraits d'ADN microbien à l'aide des amorces pA et pH\* sont en concentration différente selon que l'ADN ait été isolé par la méthode de Trevors *et al.* (1992) ou par celle de Tsai et Olson (1991). Effectivement, même si leurs patrons d'amplification sont identiques, l'extrait d'ADN obtenu par le protocole de Tsai et Olson (1991) a permis de synthétiser une plus grande quantité d'ADN par PCR que l'extrait d'ADN obtenu par le protocole de Trevors *et al.* (1992). Les amplifications réalisées avec les amorces MSTM-1L et MSTM-2C ont, quant à elles, mené à des produits de PCR très peu distincts. En effet, comme on peut le voir dans les puits 5 et 6 de la figure 16-B, les amplifications de l'ADN des microorganismes du sol ne permettent pas d'observer des patrons d'amplification clairs. Dans chaque cas, on dénote plutôt une longue traînée («smear»), représentant des fragments d'ADN d'une taille surtout comprise entre 0,2 et 2 Kb. La traînée la plus intense entre les deux était celle obtenue par suite de l'amplification effectuée avec l'ADN extrait par le protocole de Trevors *et al.* (1992) (puits 5, fig. 16-B). Toutefois, on ne peut confirmer que ces produits d'amplification étaient en quantité plus importante que ceux ayant été générés lorsque l'extrait d'ADN isolé par le protocole de Tsai et

Olson (1991) fut utilisé. On peut aussi remarquer que quelques bandes, dont la plupart sont issues de l'amplification de l'ADN microbien isolé par le protocole de Tsai et Olson (puits 6, fig. 16-B), sont visibles parmi les traînées d'ADN. Ces bandes ne peuvent toutefois pas être attribuées à une détection fiable de bactéries du genre *Streptomyces*, puisque les bandes visualisées ne correspondent pas clairement aux bandes présentes dans les patrons d'amplification d'ADN génomique de *S. scabies* et de *S. caviscabies*. Ces patrons, qui sont tous identiques, sont représentés dans le puits 3 sur la figure 16-B par le patron d'amplification de *S. caviscabies* EF-88. On peut mentionner finalement que les amorces MSTM-1L et MSTM-2C, tout comme pA et pH\*, n'ont pas permis de réaliser une détection fiable de bactéries du sol appartenant aux espèces *S. caviscabies* et de *S. scabies* à l'aide de la PCR.

## CHAPITRE 3

### DISCUSSION

#### **3.1 Les dénombrements de la population bactérienne des sols ayant subi divers amendements avec des boues résiduaires (discussion et analyse des résultats du volet 1)**

La fertilisation des sols avec des boues résiduaires est une solution de plus en plus envisagée comme mode de gestion de ce résidu (Couillard *et al.*, 1993; Grenier, 1989; MENVIQ et Ministère de la faune du Québec, 1995; Villeneuve et Poniewiera, 1992; Vandal, 1995). Les impacts de ces opérations sur la microflore des sols sont encore mal connus, d'autant plus que les boues résiduaires résultant de l'assainissement des eaux diffèrent beaucoup d'une station d'épuration à l'autre (Couillard, 1989; Couillard *et al.*, 1993; MENVIQ, 1991a). Les travaux de ce premier volet représentaient une étude préliminaire visant à tirer des conclusions générales concernant la variation du nombre des bactéries présentes dans le sol par suite d'un déversement de boues provenant de l'usine d'assainissement des eaux de la municipalité de Lac Mégantic.

Les résultats des dénombrements bactériens, effectués sur les quatre séries de sol différemment traité par des boues résiduaires, suggèrent que lorsque des boues sont déversées sur un sol, l'opération entraîne inévitablement une augmentation importante du nombre de bactéries présentes dans ce sol. En effet, on se rappellera que les constatations effectuées dans ces travaux semblaient indiquer que plus la quantité de boues ajoutée sur un sol est considérable, plus le nombre de bactéries dans ce sol devient élevé et plus l'augmentation de cette concentration bactérienne s'effectue rapidement. Comme en font foi les résultats de cette étude, la prolifération bactérienne mesurée dans ces travaux s'est produite d'une façon assez spectaculaire et a mené à des taux bactériens très élevés, certains surpassant même le taux de la série témoin par un



facteur supérieur à 5000 X, avec des valeurs côtoyant les  $10^{13}$  bactéries par gramme de sol.

Les hausses remarquables du nombre de bactéries mesurées dans les sols amendés peuvent surprendre par leur importance, mais elles étaient toutefois envisageables étant donné la forte présence de microorganismes dans les boues résiduelles (Duff *et al.*, 1995; Gaus *et al.*, 1990; MENVIQ, 1991b; Payment, 1993; Straub *et al.*, 1993; Vasseur *et al.*, 1996). De plus, une partie de l'augmentation de la concentration bactérienne dénombrée dans les sols est attribuable aux conditions de croissance mises de l'avant pour l'étude. En effet, on a pu remarquer que, même sans ajout de boues, la population de bactéries augmentait dans les sols soumis aux conditions de l'expérience. Cette constatation a été réalisée grâce à la série de sols témoins, qui ont vu leur concentration bactérienne augmenter considérablement pendant les deux premières semaines du suivi. Cette hausse de la concentration bactérienne fut provoquée surtout par le taux élevé d'humidité, qui a été maintenu par un arrosage régulier, ainsi que par la température de la chambre de croissance. Ces deux éléments s'avéraient effectivement très favorables au développement bactérien. Cependant, ce qui est le plus inquiétant, ce n'est pas vraiment la hausse du nombre de bactéries suivant la valorisation, mais plutôt le délai nécessaire pour assister au retour à la normale de la microflore. D'une façon générale, étant donné la présence possible de bactéries pathogènes ou nuisibles à différents niveaux dans la stabilité de la communauté microbienne et dans l'écosystème, plus ce délai est court, moins il y a de risque d'impacts néfastes sur la microflore du sol (Atlas, 1986; Atlas et Bartha, 1993). Dans le cas de certains sols traités dans cette étude, le délai de retour à la normale semblait assez long. En effet, lorsque le sol avait été amendé avec la quantité maximale de boues permise, le nombre de bactéries présentes dans le sol après 190 jours était toujours plus de quatre fois supérieur au nombre de bactéries présentes dans le sol n'ayant pas subi d'amendement. Par conséquent, il est possible d'en déduire que, lors des amendements, les boues ajoutées au sol ont transporté une grande quantité de bactéries qui ont proliféré considérablement durant les premières semaines et qui restent toujours fortement représentées après 190 jours dans les sols ayant reçu une dose

de boues plus grande ou équivalente à la quantité maximale de valorisation. Ce résultat semble être en accord avec ceux obtenus dans les études rapportées par Vasseur *et al.* (1996), où le taux de bactéries indicatrices de certains sols fertilisés était considérablement plus élevé que celui du sol témoin après plus d'un an, ainsi que par Burge et Marsh (1978), dans laquelle des coliformes et des streptocoques introduits dans des sols par des boues pouvaient survivre au-delà de 77 jours. Cependant, il est sans doute bon de rappeler que cette étude, menée à petite échelle en laboratoire, a conduit à des résultats qui ne tiennent pas compte de plusieurs caractéristiques relatives à une fertilisation agricole. Par conséquent, les hausses des dénombrements bactériens pourraient se manifester de façon différente lors d'une valorisation de boues à grande échelle, à cause de certains facteurs propres au milieu naturel. La majorité de ces facteurs sera d'ailleurs abordée un peu plus loin dans cette discussion.

Parmi les résultats obtenus, il peut paraître surprenant de ne pas dénombrer un taux bactérien supérieur dans les sols amendés avec une quantité de boues représentant 120% de la dose permise, par rapport aux sols ayant reçu une quantité de boues équivalente à la dose maximale légale. En effet, les résultats obtenus dans le cadre de cette étude démontrent que le développement des bactéries dans le sol atteint un seuil maximal après 14 jours, même si la quantité de boues ajoutées au sol dépasse la dose maximale légale. Ce seuil maximal, qui a pu être observé tant au niveau de la vitesse de prolifération bactérienne qu'au niveau du plus haut taux de bactéries présentes dans le sol, peut être attribuable à un effet de «saturation» du sol en cellules bactériennes. En effet, il est possible que la capacité de soutien du sol ait été à son maximum lorsque les dénombrements bactériens atteignaient des valeurs côtoyant les  $10^{13}$  bactéries par gramme de sol, puisque ce taux est considérablement plus élevé que celui normalement observable dans le sol (Atlas et Bartha, 1993; Brady, 1984; Campbell, 1983; Lynch, 1988). De plus, lorsque l'on considère que certaines bactéries et autres microorganismes, comme les champignons, n'ont pas été dénombrés par la technique utilisée, on peut déduire que la population microbienne devait atteindre des concentrations encore plus importantes dans ces

sols. Toutefois, il serait nécessaire de tenter d'autres expériences avec des sols traités différemment pour vérifier si, comme l'indique ces résultats, le seuil maximal n'est observé qu'après un amendement de boues représentant la dose maximale permise ou si il peut être attribuable au déversement d'une quantité de boues moindre. De plus, il serait d'une grande utilité de réaliser d'autres expériences, parmi lesquelles une analyse de la microflore des boues serait effectuée et où les études d'impacts seraient basées sur une plus longue période de temps et comprendraient des prises de lectures à intervalles plus courts et plus réguliers. De cette façon, une identification des espèces bactériennes introduites dans le sol par les boues serait effectuée et il serait alors possible de déterminer si on assiste réellement à un seuil maximal concernant le développement des bactéries dans les sols amendés avec une quantité de boues plus grande que la dose permise. Il serait également possible de vérifier si le plus haut taux bactérien survient vraiment après 14 jours, ou si la prolifération bactérienne se poursuit par la suite. Une expérience prolongée avec des dénombrements plus fréquents permettrait aussi de déterminer à quel rythme s'effectue le retour à la normale du taux de la population bactérienne et, surtout, après combien de temps les concentrations bactériennes des sols amendés reviennent à des valeurs similaires à celles du sol non traité.

La prolifération bactérienne très rapide menant à des taux de bactéries de l'ordre de  $10^{13}$  dans les sols amendés par la dose de boues maximale permise et le délai nécessaire, qui est supérieur à six mois, avant d'assister au retour de la population bactérienne à la même concentration que celle d'un sol n'ayant pas reçu de boues, sont les deux constatations générales pouvant être dégagées de cette étude d'impacts causés par les boues résiduelles de Lac Mégantic. Des observations telles que celles décrites dans ces travaux sont suffisamment importantes pour que la situation mérite d'être étudiée plus en profondeur et c'est pourquoi quelques suggestions sont apportées ci-haut. Cependant, les constatations ne sont pas alarmantes, car il est normal que la microflore du sol subisse des modifications par suite de nouvelles conditions environnementales que lui impose un amendement de boues résiduelles. Pour maintenir un sol fertile et en santé,

il faut toutefois s'assurer qu'une stabilité dans la communauté microbienne se rétablisse à court terme, que les espèces bactériennes importantes restent toujours présentes dans les sols et que les microorganismes pathogènes pouvant avoir été transportés par les boues redeviennent représentés en quantités équivalentes à celles pouvant être détectées dans le sol avant l'amendement (Atlas et Bartha, 1993; Chaudri *et al.*, 1993; Giller *et al.*, 1993). C'est pourquoi des travaux visant à vérifier la présence de coliformes dans les sols furent réalisés, les résultats de ces expériences sont discutés à la section 3.3.3.2. Cependant, il serait important de vérifier quelles espèces bactériennes sont le plus représentées lors de l'importante prolifération bactérienne suivant l'amendement et si, lorsque la concentration bactérienne du sol est revenue à la normale, la diversité microbienne du sol est comparable à celle qui prévalait avant la valorisation.

Finalement, comme mentionné précédemment, plusieurs facteurs, qui n'ont pas été considérés dans cette étude préliminaire, peuvent aussi influencer la réponse d'une communauté bactérienne lors d'une opération de fertilisation de sites agricoles ou sylvicoles. Effectivement, comparativement à une étude à petite échelle en laboratoire, une valorisation sur un champs comporte plusieurs variables supplémentaires comme la géographie, l'irrigation et la végétation du terrain ainsi que le climat et la saison pendant laquelle a eu lieu la fertilisation, de même que la technique d'épandage utilisée. De plus, la nature, le pH et la composition du sol ayant reçu des boues peuvent être variables entre différents terrains, ou encore entre des parcelles du même site. Ce ne sont que quelques-uns des facteurs qu'il faudra considérer pour tirer des conclusions plus précises et plus complètes lors de futures études concernant les impacts d'un amendement de boues résiduaires sur le nombre de bactéries de la microflore du sol.

### **3.2 Les dénombrements des populations bactériennes résistantes aux métaux lourds dans les sols fertilisés avec des boues résiduaires (discussion et analyse des résultats du volet 2)**

Les concentrations importantes de métaux lourds contenues dans les boues résiduaires constituent un des problèmes majeurs quant à leur utilisation comme fertilisant (Hamilton *et al.*, 1984; McBride, 1995; Witter, 1989). Il est connu que les principaux métaux sont déjà présents de façon naturelle dans les sols, mais il est fort probable que la teneur en métaux lourds du sol augmente par suite de l'amendement d'un site avec des boues d'épuration. Il faut donc se préoccuper de leur présence, puisque l'arrivée de fortes doses de métaux lourds dans les sols peut mener à des conséquences néfastes sur les microorganismes du sol et sur l'ensemble de cet écosystème. Quelques-unes de ces conséquences possibles ont d'ailleurs été évoqués dans l'introduction. Par conséquent, lors d'opérations de fertilisations agricoles ou sylvicoles, il est essentiel que les concentrations de métaux lourds dans les sols traités avec des boues résiduaires n'atteignent pas des niveaux pouvant mettre en péril la santé et la stabilité de la microflore du sol. Dans presque tous les pays, il existe des lois qui définissent les concentrations de métaux lourds à ne pas dépasser pour éviter toute contamination environnementale (Petruzzelli, 1989). À ce chapitre, les normes québécoises semblent posséder une bonne marge de sécurité, puisqu'elles sont parmi les plus sévères au monde (Beauchemin *et al.*, 1993). Il est tout de même nécessaire de vérifier si les normes actuelles régissant la valorisation de ce résidu sont adéquates. Les travaux de ce deuxième volet consistaient en une étude préliminaire visant à tirer des conclusions générales concernant la validité des normes de valorisation agricole des boues résiduaires du MENVIQ (1991b) et la concentration de métaux lourds dans les boues valorisées sur les champs sélectionnés pour cette étude. Pour ce faire, étant donné qu'une augmentation de la concentration d'un métal lourd dans le milieu peut, par sélection naturelle, provoquer un accroissement du nombre de bactéries résistantes à ce métal, une vérification de la hausse possible des populations résistantes à différents métaux lourds dans la communauté bactérienne

de sols agricoles fertilisés avec des boues résiduelles de la municipalité de Princeville et de Lac Mégantic a été effectuée.

### **3.2.1 La comparaison entre les dénombrements de bactéries résistantes à chacun des métaux lourds des parcelles fertilisées et des parcelles témoins de chaque site d'étude**

À la lumière des résultats des nombreux dénombrements bactériens effectués sur les sols à l'étude grâce aux différents milieux spécifiques, il semble que l'ajout des boues résiduelles sur les champs agricoles n'ait pas provoqué d'augmentation des populations de bactéries du sol résistantes au cadmium, au cobalt, au cuivre, au molybdène, au nickel, au sélénium et au zinc. En effet, il n'a pas été possible de détecter des différences significatives entre les taux bactériens des parcelles ayant reçu des boues résiduelles et celles n'en ayant pas reçu et ce, indépendamment des boues utilisées ou du laps de temps écoulé entre la fertilisation et la cueillette des échantillons. Même dans les sols de la municipalité de Princeville, qui sont les sites où l'on pouvait le plus s'attendre à noter des perturbations, puisque ces sites n'avaient été valorisés respectivement qu'un an et un mois avant les dénombrements, aucune différence n'a pu être confirmée entre les parcelles fertilisées et non fertilisées. Parce qu'il a été démontré que l'introduction de métaux lourds dans le sol peut provoquer l'augmentation de bactéries résistantes à ceux-ci (Diaz-Ravina *et al.*, 1994; Diaz-Ravina et Baath, 1996), les résultats de cette étude pourraient facilement mener à la conclusion que les boues valorisées ne représentaient pas l'ajout d'une quantité de métaux lourds suffisante pour que le nombre de bactéries ayant développé une résistance à ces derniers augmente. Il faut cependant mentionner que ces expériences constituaient une étude préliminaire et que, parce que les interactions entre les microorganismes et les métaux lourds sont très complexes, quelques éléments resteraient à considérer pour confirmer, hors de tout doute, que les fertilisations effectuées ne permettent pas l'émergence de nouvelles bactéries résistantes aux métaux lourds. En effet, la toxicité représentée par un métal lourd, qui peut entraîner une hausse du nombre de bactéries ayant

développé une résistance à ce métal, est sous la dépendance de plusieurs facteurs relatifs aux microorganismes, aux métaux lourds, aux boues résiduelles et aux caractéristiques physico-chimiques du sol (Stotzky et Babich, 1980). Des facteurs abiotiques comme le pH, la température, la capacité d'échange cationique (CEC), l'humidité, la pression, la force ionique, la matière organique en présence ainsi que la texture et le type de sol peuvent tous être déterminants de la toxicité environnementale d'un métal lourd car ils contrôlent, avec les processus chimiques et biologiques survenant dans le sol et les boues, la biodisponibilité des métaux (Babich et Stotzky, 1980; Chaney, 1980; Harter, 1983; Hooda et Alloway, 1993; Jing et Logan, 1992; Kuo et Baker, 1980; Logan et Chaney, 1983; Mesquita *et al.*, 1994; Mininni et Santori, 1987; Obbard *et al.*, 1993; Petruzzelli, 1989; Petruzzelli *et al.*, 1994; Sanchez-Martin et Sanchez-Camazano, 1993; Zevenhuizen *et al.*, 1979). Cette biodisponibilité, qui constitue un des facteurs les plus importants à considérer dans une étude concernant les impacts d'une introduction possible de métaux lourds dans le sol (Logan et Chaney, 1983), est aussi influencée par des caractéristiques propres aux métaux. Effectivement, la forme des métaux en présence, leur solubilité, leur concentration ainsi que leur potentiel ionique sont tous des éléments qui peuvent influencer leur biodisponibilité en modifiant l'habileté qu'ont les métaux à former des complexes avec de nombreux ligands (Baker *et al.*, 1979; Bingham, 1979; Chaney, 1980; Garcia-Miragay et Page, 1976; Grenier, 1989; Hahne et Kronntje, 1973; Mesquita *et al.*, 1994; Msaky et Calvet, 1990; Obbard *et al.*, 1993; Petruzzelli, 1989). Finalement, les microorganismes du sol et leurs activités (Obbard *et al.*, 1993), les végétaux poussant sur les sites fertilisés ainsi que la composition des boues et leur effet protecteur (McBride, 1995), sont quelques-uns des autres facteurs qui peuvent influencer la biodisponibilité des métaux et, par conséquent, le comportement des populations bactériennes du sol mesuré dans ces travaux.

Quelques autres considérations doivent aussi entrer en ligne de compte lorsque l'on analyse les résultats de cette étude. Celles-ci ne concernent pas le sol, les boues ou la biodisponibilité des métaux lourds, mais plutôt les méthodes utilisées et les expériences réalisées pour obtenir les

résultats. En effet, même si la méthode préconisée pour l'obtention des résultats est fiable, utile et fortement employée, elle comporte tout de même quelques lacunes. Une d'entre elles a trait à la manipulation des échantillons, qui amène inévitablement le changement de certaines conditions, comme le taux d'humidité et la spatialité du milieu. Ceci a pour incidence de modifier, d'une façon plus ou moins importante, les propriétés originales du sol à l'étude. Par la suite, une fois les échantillons obtenus, les limitations de la technique utilisée ont rapport avec les conditions de cultures employées. Effectivement, il est impossible de reproduire les mêmes conditions variables de croissance offertes par le sol de provenance de l'inoculum, notamment quant à la composition du milieu, au pH, aux nutriments, aux organismes en présence ainsi que tout ce qui a trait à la forme, à la concentration et à la diversité des métaux lourds. De plus, on ne peut passer sous silence le fait que certains métaux lourds forment des complexes avec de nombreux ligands organiques et inorganiques, ce qui diminue leur biodisponibilité et protège les bactéries contre leurs effets toxiques (Baker *et al.*, 1979; Bingham, 1979; Chaney 1980; Duxbury, 1986; Garcia-Miragaye et Page, 1976; Grenier, 1989; Hahne et Kronntje, 1973; Hallas *et al.*, 1982; Mesquita *et al.*, 1994; Msaky et Calvet, 1990; Obbard *et al.*, 1993; Petruzzelli, 1989; Pickett et Dean, 1976, 1979). Par conséquent, les dénombrements obtenus par les décomptes de bactéries sont dépendants de la capacité des différents milieux spécifiques à effectuer des complexes d'éléments et ils sont sous-estimés par rapport à la réalité et par rapport aux dénombrements pouvant être mesurés par quelques autres techniques, comme celle de l'incorporation de thymidine (Diaz-Ravina *et al.*, 1994; Hallas *et al.*, 1982). De plus, dans ces travaux, la résistance bactérienne fut mesurée vis-à-vis de chaque métal, alors qu'il a été prouvé que plusieurs bactéries ne pouvaient être sensibles qu'à une combinaison de quelques métaux lourds (Bewley et Campbell, 1980; Oehme, 1978). Toutes ces considérations font en sorte que les informations pouvant être récoltées en rapport avec les impacts des métaux lourds sur la microflore du sol sont difficiles à analyser et la corrélation entre les effets observés et les agents qui les causent n'est pas évidente à réaliser en tenant compte de tous les facteurs environnementaux. Toutefois, les travaux réalisés dans cette étude avaient leur raison d'être



puisque, d'une part, la méthode utilisée, quoique limitée, s'est souvent avérée fort utile lors d'études antérieures où des dénombrements de bactéries résistantes à certains métaux lourds devaient être effectués (Austin *et al.*, 1977; Bewley et Campbell, 1980; Hallas *et al.*, 1982; Lighthart, 1980; Pickett et Dean, 1976; Wong, 1980) et, d'autre part, l'objectif poursuivi par cette étude préliminaire n'était pas de déterminer le nombre réel de bactéries résistantes aux métaux lourds, mais de vérifier si des variations importantes pouvaient survenir dans les populations bactériennes résistantes aux métaux lourds après la fertilisation de champs agricoles avec des boues résiduaires. Par conséquent, les résultats récoltés suffisent à affirmer que les déversements des boues de Lac Mégantic et de Princeville n'ont pas provoqué d'augmentations significatives et marquées des populations bactériennes résistantes aux sept métaux lourds dans les cinq sites à l'étude.

Le fait que les résultats de ces travaux ne montrent aucune différence entre les populations bactériennes des parcelles fertilisées et non fertilisées des sites à l'étude n'est pas surprenant. En effet, une augmentation des populations bactériennes résistantes aux métaux lourds dans les sols amendés aurait été surprenante, puisque les quantités de boues déversées sur les cinq champs agricoles à l'étude correspondaient à des amendements situés entre 27% et 47% de la dose maximale permise, ce qui est loin de la norme limite. De plus, dans la région de Princeville comme dans celle de Lac Mégantic, les boues épandues sur les sites traités à court, moyen et long termes ne présentaient pas de teneurs anormalement élevées en métaux lourds. En fait, les concentrations de métaux lourds mesurées dans les boues étaient généralement bien en deçà de la norme recommandable proposée par le MENVIQ (1991b) (voir annexe A-I). Il n'y avait que les boues résiduaires de la municipalité de Lac Mégantic, utilisées pour la fertilisation des sites amendés en 1991 et en 1992, qui présentaient une teneur en cuivre et en molybdène (boues utilisées en 1992 seulement) supérieure à la limite souhaitable (annexes A-IV et A-V). Cependant, même dans le cas de ces teneurs en cuivre et en molybdène, les concentrations mesurées dans les boues restaient toujours inférieures à la limite maximale permise dans le guide

des bonnes pratiques de valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales (MENVIQ, 1991b). À la lumière de ces constatations, il est possible de déduire que l'augmentation de la charge en métaux lourds dans les sols, qui s'est inévitablement produit avec l'apport des boues, était probablement mineure, donc insuffisante pour provoquer une augmentation de bactéries résistantes aux métaux lourds étudiés. Il est aussi probable que l'effet protecteur des boues résiduelles rapporté par McBride (1995) ait maintenu les teneurs en métaux disponibles à des niveaux relativement faibles. Les données obtenues, grâce aux analyses du contenu en métaux lourds disponibles des sols étudiés (annexe B) qui avaient été effectués sur quatre métaux lourds (Cd, Cu, Pb, Zn), abondent aussi dans le même sens. En effet, par suite des tests statistiques d'analyse de variance de Kruskal-Wallis, d'ANOVA et de Tukey effectués sur ces données par Lefebvre (1996), il a été prouvé que dans les cinq sites ayant été échantillonnés de un à cinq ans après l'épandage des boues, aucune augmentation statistiquement significative de leur contenu en métaux lourds disponibles n'a pu être détectée après leur fertilisation. On a donc lieu de croire que, dans le sol des sites sélectionnés, la disponibilité des autres métaux lourds de l'étude (Co, Mo, Ni, Se) ait pu se comporter de façon semblable et que, par conséquent, aucune hausse du nombre des bactéries résistantes aux métaux lourds n'était normalement attendue. C'est par ailleurs cette prédiction qui a été confirmée par les résultats obtenus dans le cadre de ces travaux et qui fut discutée et élaborée ci-haut. Les résultats de cette étude abondent donc dans le même sens que celle menée par Lefebvre (1996), dans laquelle les sites à l'étude étaient les mêmes que les nôtres. Effectivement, cette étude a confirmé que les fertilisations avec des boues n'avaient pas constitué un apport de métaux lourds assez considérable dans le sol pour qu'augmentent la teneur en métaux lourds de la végétation qui y poussait et celle des bovins qui le fréquentaient. Toutefois, les résultats recueillis dans ces travaux ne permettent pas de tirer des conclusions valables quant à l'efficacité des normes québécoises. En effet, même si aucune perturbation de la microflore n'a pu être observée, on ne peut conclure qu'aucun problème ne peut survenir par suite d'un amendement respectant les normes de valorisations actuelles puisque les fertilisations étudiées dans ces travaux ne

représentaient pas les limites maximales permises concernant la quantité de boues épandue et les concentrations de métaux lourds contenues dans les boues. Par conséquent, dans cette étude, l'augmentation significative de bactéries résistantes à un ou des métaux lourds dans le sol traité par rapport au témoin, aurait été le seul résultat qui aurait permis une conclusion valable concernant les normes de valorisation des boues. Effectivement, cela aurait été le témoignage de normes inadéquates, puisque des effets néfastes auraient été observés par suite de valorisations situées bien en deçà des limites légales. Cependant, tel ne fut pas le cas.

La conclusion principale pouvant être tirée de ce 2<sup>e</sup> volet des travaux est que des fertilisations non répétées, de la même importance que celles ayant fait partie de cette étude, avec des boues résiduelles de Lac Mégantic ou de Princeville, semblent être une option sécuritaire et recommandable au point de vue du contenu en métaux lourds des boues et de l'augmentation de la charge de métaux lourds dans le sol. Toutefois, comme il est impossible de faire de plus amples recommandations concernant la valorisation à court et à long terme à la suite de cette étude, celle-ci devrait être perçue comme un travail exploratoire général pouvant servir d'indicateur pour de futures recherches. En effet, il est important de ne pas percevoir les résultats de cette étude comme trop encourageants, car la prudence et la vigilance devraient rester de mise jusqu'à ce que des études plus complètes soient effectuées. Par conséquent, la suggestion dominante ressortant de ces travaux est de poursuivre d'autres études visant à déterminer les conditions permettant d'utiliser les boues de la façon la plus sécuritaire possible lors de valorisations agricoles ou sylvicoles. Pour être utiles, ces études futures devront comprendre un effectif plus large et considérer plusieurs facteurs importants. En effet, pour tenir compte de la variabilité du sol et des boues valorisées ainsi que pour effectuer des analyses statistiques complètes, un échantillonnage plus considérable sera nécessaire. De plus, pour que des conclusions relatives aux normes québécoises de valorisation puissent être obtenues, il faudrait absolument que, parmi les différentes quantités de boues à l'étude, une quantité représentant la dose maximale permise, comprenant des concentrations limites en métaux lourds,

fasse partie des expérimentations. Il est également à souhaiter que les parcelles de sol subissant les amendements proviennent du même site. De cette façon, une partie non négligeable des variables propres au sol et aux végétaux qui y poussent pourrait être éliminée et l'analyse du contenu des sols deviendrait alors moins fastidieuse. Il faudrait aussi pouvoir tenir compte de la possibilité qu'il y ait des toxicités bactériennes causées par la combinaison de plusieurs éléments. En effet, il a été démontré que certains métaux lourds, en faibles concentrations, peuvent avoir des effets toxiques lorsque combinés entre eux ou avec d'autres polluants environnementaux (Bewley et Campbell, 1980; Oehme, 1978). Il serait aussi très intéressant d'effectuer des études à long terme sur les sols fertilisés pour déterminer, dans le cas où des perturbations seraient survenues au niveau de la microflore, après combien de temps un retour à la normale est observable ainsi que pour suivre le comportement des différents métaux lourds ajoutés au sol et mesurer les impacts qu'ils pourraient causer sur cet écosystème. Effectivement, il est possible que certains effets nuisibles ne se manifestent qu'après un long laps de temps suivant l'ajout des boues sur le sol; il est donc important de faire un suivi à long terme des métaux dans l'environnement. Ce suivi pourrait répondre à certaines questions clés concernant les effets négatifs potentiels d'une augmentation de la charge en métaux lourds du sol, notamment : après combien de temps l'effet protecteur des boues (McBride, 1995), qui maintient la teneur du sol en éléments disponibles à des niveaux très bas, s'atténue-t-il? Est-ce que les métaux continueront à s'accumuler dans le sol ou seront-ils relâchés sous des formes biodisponibles de façon graduelle? Est-ce que la microflore et les végétaux pourraient s'adapter à une augmentation plus ou moins brusque de la concentration de métaux disponibles dans le sol? Puisque les bactéries développant une résistance à un métal lourd ont tendance à croître sous un pH optimum plus bas que leurs semblables non résistantes (Diaz-Ravina et Baath, 1996), est-ce qu'une baisse de pH provoquerait l'émergence de nouvelles populations bactériennes résistantes aux métaux lourds ? Est-ce qu'un changement majeur des conditions du sol, comme une diminution de pH, pourrait permettre une solubilisation draconienne des métaux lourds non disponibles et ainsi mener à des conditions toxiques pour certains microorganismes? Ce ne sont

là que quelques-unes des questions importantes que suscite l'apport de métaux lourds au sol au moyen de fertilisations agricoles avec des boues résiduaires.

Finalement, il faut retenir qu'une approche prudente doit être considérée lorsque des boues résiduaires sont valorisées sur des champs agricoles, afin de maintenir la fertilité des sols de façon permanente et pour éviter que différents effets néfastes surviennent sur la microflore du sol et sur l'ensemble de l'écosystème. En ce sens, les recherches dans ce domaine doivent se poursuivre pour déterminer quel est le meilleur système de valorisation possible et pour continuer à trouver de nouvelles avenues et de meilleures techniques d'assainissement des eaux usées, telle l'introduction de bactéries chimiolithotrophes dans les traitements pour éliminer avec succès les métaux lourds (Couillard et Mercier, 1990, 1991; Shooner et Tyagi, 1995; Tyagi *et al.*, 1993). Pour ce faire, une coopération entre les chercheurs de plusieurs disciplines serait à souhaiter. De plus, comme il est pratiquement impossible de tirer des conclusions valables et exactes d'ordre général, chaque série d'opérations de valorisations devrait être considérée comme un cas individuel et étudiée comme tel. De cette façon, les gestionnaires seront plus en mesure d'identifier des sols plus aptes pour l'application de ce résidu organique et de suggérer des normes, des taux, ainsi que des méthodes d'épandage de boues résiduaires pour maximiser la fertilité des sols et minimiser la possibilité que des impacts néfastes surviennent.

### **3.2.2 La comparaison entre les dénombrements des bactéries résistantes au même métal lourd dans le sol des cinq sites d'étude**

Le deuxième type de descriptions effectué à l'aide des résultats obtenus dans ces travaux était basé sur des comparaisons réalisées entre les dénombrements des bactéries résistantes au même métal lourd dans le sol des cinq sites à l'étude. Il est évident que ces comparaisons sont beaucoup moins intéressantes que celles discutées ci-haut, puisque celles-ci permettaient de déterminer l'impact des boues résiduaires sur certaines populations bactériennes du sol. En effet,

étant donné qu'il n'a pu être démontré que les amendements de boues à l'étude provoquaient des augmentations notables des bactéries résistantes aux métaux lourds, les comparaisons réalisées entre les cinq champs ne peuvent conduire à de plus amples informations concernant les effets des boues sur la microflore du sol. Pour cette raison, les résultats des comparaisons entre les champs de l'étude sont beaucoup moins pertinents et c'est pourquoi ils ne seront pas discutés de façon très exhaustive. Tout de même, les quelques différences de dénombrements bactériens qui avaient été identifiées lors de la description des résultats seront scrutées de plus près.

Une des différences retenant l'attention parmi celles relevées entre les populations bactériennes résistantes au même métal lourd entre les cinq sites à l'étude, est qu'il n'y a qu'un seul cas où le nombre de bactéries résistantes à un métal était différent entre les trois champs de la région de Lac Mégantic. En effet, le nombre de bactéries résistantes au zinc dans le sol du champ Lac Mégantic B était inférieur à celui des deux autres champs de la même municipalité et ce, même si la quantité de zinc disponible dans ces sols n'était pas significativement différente (Lefebvre, 1996). Il est extrêmement difficile d'arriver à une réponse définitive et incontestable qui expliquerait cette différence car, d'une part, la proximité entre deux champs situés dans la même région n'implique pas qu'ils aient nécessairement une composition identique ou très semblable. D'autre part, la résistance bactérienne au zinc, qui est le métal ayant mené aux plus grandes variations dans les résultats de cette étude, est certainement sous l'influence d'une combinaison de plusieurs variables. Par conséquent, la détermination des facteurs qui ont résulté en une différence du nombre de bactéries résistantes au zinc entre les sites de Lac Mégantic n'est pas qu'une simple tâche et elle devient trop fastidieuse pour faire partie d'une étude préliminaire comme celle-ci. Il en est de même pour les autres variations des populations bactériennes résistantes à certains métaux lourds, celles qui ont été observées entre les champs de la municipalité de Princeville et celles de la municipalité Lac Mégantic. En effet, puisque les populations résistantes aux métaux lourds entre les parcelles traitées et non traitées des sites à l'étude étaient les mêmes, on ne peut qu'affirmer que les différences entre les populations

bactériennes des cinq champs ne sont pas causées par l'ajout des différentes boues résiduaire sur les sols, mais plutôt par une équation de plusieurs facteurs relatifs aux microorganismes, aux métaux lourds, aux sols ainsi qu'aux conditions climatiques qui interagissent. La plupart de ces déterminants furent d'ailleurs énumérés et discutés dans la première partie de ce volet (voir section 3.2.1) et le seul duquel nous avons recueilli des données consiste en le nombre de bactéries totales présentes dans les sols à l'étude. Effectivement, grâce au milieu de référence ne contenant aucun métal lourd, des dénombrements de bactéries totales des sols ont pu être effectués. Ces décomptes, représentant le nombre total de bactéries présentes dans le sol des champs étudiés dans ces travaux, constituent un des facteurs influençant directement l'importance des populations bactériennes résistantes aux métaux lourds. Par conséquent, les décomptes des bactéries totales pourraient représenter une hypothèse pouvant expliquer les quelques différences observées entre les populations bactériennes résistantes à certains métaux entre les champs. En effet, plus la concentration bactérienne d'un sol est considérable, plus la probabilité est grande d'y retrouver des bactéries résistantes à divers métaux lourds. C'est justement ce qu'il a été possible de remarquer lors de cette étude puisque, dans tous les cas mentionnés lors de la description des résultats (section 2.2.2), lorsque le nombre de bactéries résistantes à un métal lourd était significativement plus élevé dans un sol que dans un autre, les bactéries totales qu'il contenait étaient aussi en concentration plus importante que celle du sol présentant un nombre plus faible de bactéries résistantes au métal concerné. Il est finalement bon de mentionner que même si les augmentations de bactéries du sol résistantes à certains métaux lourds observées entre les cinq champs à l'étude peuvent être partiellement imputables à la concentration de bactéries totales des sols en question, la corrélation observée dans le cadre de ces travaux entre ces deux constats reste une hypothèse à confirmer.

### **3.3 Le développement d'une technique efficace de détection microbienne pour des sols ayant reçu un épandage de boues résiduelles, la vérification de la présence possible de coliformes dans des sols amendés et la différenciation de certaines espèces bactériennes du genre *Streptomyces* (discussion et analyse des résultats du volet 3)**

Pour les nombreux avantages qu'elles comportent, dont la non-nécessité de cultiver les cellules en laboratoire, les techniques de biologie moléculaire sont des avenues toujours de plus en plus utilisées en recherche environnementale et en écologie microbienne. De ces techniques, la détection de microorganismes présents dans des échantillons environnementaux, à l'aide de la «Polymerase Chain Reaction» (PCR), est parmi les plus fréquentes et les plus prometteuses. D'ailleurs, le principal sous-objectif du troisième volet de ces travaux était de mettre au point une technique efficace de détection microbienne pour des sols amendés par des boues résiduelles. Il s'agissait ainsi de déterminer les conditions de PCR permettant l'amplification efficace d'ADN cible à l'aide des amorces utilisées. Cependant, pour ce faire, il fallait en premier lieu développer une technique simple et efficace qui permettrait d'obtenir, en un temps relativement court, de l'ADN microbien provenant de plusieurs petits échantillons de sol et que ces extraits soient suffisamment purs pour permettre des études par PCR. Finalement, à l'aide de cette méthode de détection par PCR, nous avons pu atteindre les deux autres sous-objectifs de ce volet, qui représentaient la vérification de la présence possible de coliformes dans des sols ayant reçu différentes doses de boues ainsi que la détection et la différenciation de certaines bactéries du genre *Streptomyces*.

#### **3.3.1 La comparaison des cinq protocoles d'exaction de l'ADN des microorganismes du sol expérimentés et la détermination de la technique la plus adéquate aux détections microbiennes par PCR**

Depuis deux décennies, plusieurs biologistes moléculaires ont développé des méthodes



d'extraction d'ADN des microorganismes du sol pouvant être utiles pour des études et des analyses de toutes sortes. Les cellules cibles dont on voulait extraire l'ADN ont presque toujours été isolées du sol avant leur lyse, mais, depuis un peu plus de cinq ans, les techniques directes, où la lyse cellulaire s'effectue directement dans le sol, sont les plus utilisées. L'objectif de cette partie des travaux était de sélectionner un protocole d'extraction de l'ADN des microorganismes du sol pouvant être utilisé à petite échelle. Ce protocole se devait d'être simple, assez rapide et offrant un bon rendement au point de vue de la taille et de la quantité d'ADN obtenu. Pour ce faire, quatre techniques d'extraction d'ADN directes et une technique d'extraction d'ADN indirecte ont été expérimentées pour en déterminer la plus efficace.

La première constatation qui s'impose par suite de l'observation des résultats obtenus des cinq protocoles étudiés, est que le rendement de la technique indirecte, soit celle de Steffan et Atlas (1988), est inférieur à celui des quatre autres méthodes d'extraction. Cette technique indirecte qui, à partir d'un gramme de sol, n'a permis d'isoler qu'au maximum 1 µg d'ADN, dont les fragments avaient une taille moyenne de 1,5 Kb, a offert un rendement semblable à celui rapporté précédemment par Steffan et Atlas (1988), à l'exception que cette publication cite des fragments d'une taille supérieure à 9,4 Kb. Toutefois, à la lumière des résultats obtenus dans ces travaux, les protocoles d'extraction directe sélectionnés pour cette étude ont tous offert des résultats plus intéressants que celui par méthode indirecte proposée par Steffan et Atlas (1988) et ce, tant au niveau de la quantité d'ADN obtenue que de la taille des fragments de cet ADN. Ce résultat n'est cependant pas surprenant, puisque la plupart des méthodes d'extraction directe d'ADN offrent des rendements supérieurs à ceux des méthodes d'extraction d'ADN indirectes (Jacobsen et Rasmussen, 1992; Steffan *et al.*, 1988). En effet, même si les techniques d'extraction directes comportent certains inconvénients par rapport aux techniques d'extraction indirectes, comme la possibilité de coextraire de plus importantes quantités d'acides humiques ou de d'autres substances contaminantes (Steffan *et al.*, 1988; Volossiuk *et al.*, 1995) ainsi que la plus grande probabilité de briser l'ADN et de réduire la taille des fragments (Steffan *et al.*, 1988), elles

restent néanmoins les méthodes les plus avantageuses des deux types. Les principaux avantages apportés par l'utilisation d'un protocole d'extraction directe sont la plus grande efficacité d'extraction, menant à une récolte d'ADN de beaucoup supérieure à celle des extractions indirectes (Jacobsen et Rasmussen, 1992; Porteous et Armstrong, 1991; Steffan *et al.*, 1988; Tsai et Olson, 1991), la possibilité d'obtenir l'ADN contenu dans des cellules fortement liées à différents agrégats (Picard *et al.*, 1992) et le peu de temps nécessaire pour réaliser ces extractions (Jacobsen et Rasmussen, 1992). De plus, une technique d'extraction directe permet d'isoler une plus grande diversité d'ADN que les techniques indirectes (Porteous et Armstrong, 1991). Une autre des caractéristiques propres aux extractions directes est que celles-ci rendent possible l'isolement d'ADN non dégradé qui fut libéré dans le sol par suite de la mort de microorganismes (Selenska et Klingmuller, 1991). Cette caractéristique ne peut toutefois pas être considérée comme un avantage des techniques directes puisque, selon les objectifs visés par l'étude en question, elle pourrait constituer aussi bien un atout qu'un inconvénient. Finalement, c'est pour les nombreux avantages qu'elles offrent que les techniques d'isolement d'ADN par extraction directe représentaient quatre des cinq protocoles expérimentés dans ces travaux. Enfin, les méthodes choisies pour les expériences de PCR étaient toutes des techniques d'extraction directe.

Lorsque l'on regarde les résultats des isollements d'ADN, on s'aperçoit que même si tous les protocoles d'extraction directe expérimentés dans ces travaux ont offert des rendements supérieurs à celui obtenu par la méthode indirecte de Steffan et Atlas (1988), il en reste qu'on dénote de très importantes différences entre les extraits générés par ces quatre méthodes. En effet, selon la méthode d'extraction directe utilisée, le rendement variait de 3 à 12 µg d'ADN/g de sol et la taille des fragments d'ADN obtenus pouvait être située entre 0,5 Kb et 23 Kb. Parmi les quatre méthodes d'extraction directes, c'est le protocole de Volossiuk *et al.* (1995) qui s'est avéré le moins intéressant avec un rendement autour de 3 µg d'ADN/g de sol et comprenant de l'ADN ayant subi une dégradation sévère, comme en font foi les courts fragments isolés qui

avaient une taille surtout comprise entre 0,5 et 3 Kb. Puisque des fragments d'ADN de cette taille ne sont pas souhaitables pour des analyses par PCR, à cause du haut risque de formation de produits chimériques durant la réaction (Liesack *et al.*, 1991) et parce que le rendement offert par ce protocole était faible, celui-ci a donc facilement été éliminé de la démarche entreprise dans le but de déterminer la technique d'extraction d'ADN la plus avantageuse. Il en fut de même pour la méthode proposée par Bruce *et al.* (1992) puisque, même avec des extraits d'ADN plus intéressants que ceux obtenus par le protocole de Volossiuk *et al.* (1995), son rendement restait toujours inférieur à ceux des deux autres techniques d'extraction d'ADN directes, soit celle de Trevors *et al.* (1992) ainsi que celle de Tsai et Olson (1991). En effet, le protocole de Bruce *et al.* (1992) a permis d'isoler environ 4 à 6 µg d'ADN par gramme de sol, ce qui demeure en deçà des quantités extraites par les protocoles de Trevors *et al.* (1992) et de Tsai et Olson (1991). Il faut mentionner que la taille des fragments, qui était supérieure à 9,4 Kb, ainsi que la quantité d'ADN recueilli grâce au protocole de Bruce *et al.* (1992) sont conformes à celles obtenues par les auteurs de cette publication. Il est toutefois bon de noter que les rendements rapportés dans les publications peuvent servir de repères, mais ils peuvent différer considérablement de ceux obtenus dans ces travaux puisque les concentrations des extraits d'ADN peuvent varier énormément d'une étude à l'autre. Effectivement, plusieurs facteurs influencent la quantité d'ADN pouvant être isolée par une même technique. Parmi ceux-ci, il y a les nombreuses caractéristiques du sol de provenance de l'échantillon ainsi que la composition, la diversité et le nombre d'individus constituant la communauté microbienne en présence dans le sol (Porteous et Armstrong, 1991; Smalla *et al.*, 1993; Trevors *et al.*, 1992; Tsai et Olson, 1991; Zhou *et al.*, 1996). La méthode de quantification de l'extrait d'ADN peut aussi être une des causes de variabilité entre les rendements obtenus d'une même technique d'extraction d'ADN. En effet, cette quantification peut avoir été approximative, comme c'est le cas pour les déterminations de concentrations effectuées à l'aide de techniques spectrophotométriques, ce qui fait en sorte que le rendement réel de l'extraction peut être surestimé à cause des contaminants, comme les protéines, l'ARN et l'ADN dénaturé, qui peuvent toujours être présents dans le milieu (Bakken,

1985; Porteous et Armstrong, 1991; Torsvik, 1980; Trevors *et al.*, 1992). Pour cette raison, dans ces travaux, les quantifications ont été réalisées par comparaison entre l'intensité de l'extrait d'ADN ayant subi l'électrophorèse et celle d'un standard, ce qui signifie que même si le résultat reste approximatif, le rapport relatif entre les différents rendements est valable. Lorsque l'on compare l'efficacité de différents protocoles, il faut aussi porter une attention particulière à la quantité de sol à laquelle se rapporte la valeur du rendement. Effectivement, certains auteurs indiquent la quantité d'ADN obtenue en microgrammes d'ADN par gramme de sol sec, ce qui est très différent du rendement d'extraction d'ADN rapporté en poids de sol humide. Finalement, les techniques de purification utilisées pour les extraits éliminent aussi de l'ADN et font en sorte que la concentration de celui-ci tend à diminuer à chacune des étapes de purification. Il faut donc faire attention de ne pas comparer aveuglément les rendements des nombreuses extractions d'ADN rapportés dans les publications. Quant aux rendements des protocoles expérimentés dans ces travaux et qui sont exprimés en poids humide, ils s'avèrent tous comparables aux valeurs rapportées par les auteurs respectifs des méthodes proposées.

Après la mise à l'écart des trois méthodes qui offraient les plus faibles rendements, deux protocoles demeuraient en lice. En effet, des cinq méthodes expérimentées, ce sont les protocoles de Trevors *et al.* (1992) et de Tsai et Olson (1991) qui se sont avérés susceptibles d'offrir les meilleurs rendements. De ces deux techniques, c'est celle proposée par Tsai et Olson (1991) qui représentait l'extraction d'ADN la plus efficace avec un rendement approximatif de 12 µg d'ADN/g de sol et menant à des extraits qui contenaient des molécules d'ADN très peu fragmentées avec une taille d'environ 23 Kb. Ce protocole est probablement plus efficace que celui de Trevors *et al.* (1992) à cause du traitement de congélation/décongélation qu'il comprend. En effet, les deux protocoles proposent une lyse cellulaire semblable, constituée d'un traitement au SDS combiné à une digestion enzymatique, mais celui de Tsai et Olson (1991) contient, en plus, une étape de congélation/décongélation. Par conséquent, puisque ce traitement lytique constitue l'une des techniques les plus efficaces pour lyser des bactéries Gram positives (Bollet

*et al.*, 1991), son ajout à un protocole peut permettre d'augmenter le rendement de l'extraction d'ADN. Il est donc fort probable que ce traitement ait été la cause du très bon rendement démontré par la méthode de Tsai et Olson (1991). Cependant, même si cette dernière représentait la technique d'extraction la plus efficace et qu'elle fut retenue pour les expériences suivantes, le protocole proposé par le groupe de Trevors *et al.* (1992) ne fut pas écarté du reste des travaux. Effectivement, malgré son rendement un peu plus faible et son degré de dégradation d'ADN plus élevé que ce qu'il a été possible d'obtenir par suite des extractions d'ADN par la méthode directe de Tsai et Olson (1991), le protocole de Trevors *et al.* (1992) menait à des résultats suffisamment intéressants pour être expérimenté davantage. D'ailleurs, en plus de permettre l'isolement de fragments plus grands que 9,4 Kb et de conduire à une récolte très respectable de 8 à 9 µg d'ADN/g de sol, la méthode de Trevors *et al.* (1992) a mené à l'obtention des extraits d'ADN les plus propres des cinq protocoles étudiés. En effet, on a pu constater que la couleur des extraits d'ADN recueillis à l'aide de cette méthode était beaucoup plus pâle que celle observée sur les extraits obtenus des quatre autres techniques à l'étude, ce qui confirme que moins de contaminants ont été coextraits avec l'ADN. La concentration plus faible de substances contaminantes que contenaient ces extraits d'ADN est certainement due à l'ajout de PVPP à la première mixture de cette procédure d'extraction. Effectivement, il a été démontré dans plusieurs études que cette substance adsorbante peut éliminer efficacement une large partie des composés humiques et ainsi augmenter la pureté et la qualité des extraits d'ADN et ce, sans diminuer le rendement en quantité d'ADN (Atlas et Bartha, 1993; Holben *et al.*, 1988; Steffan *et al.*, 1988; Trevors *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1996). La plus grande pureté de l'ADN isolé par le protocole de Trevors *et al.* (1988) est la principale raison pour laquelle cette méthode d'extraction d'ADN fut, elle aussi, retenue pour la continuité de ces travaux.

En résumé, les méthodes d'extraction d'ADN directes rapportées par Tsai et Olson (1991) et par Trevors *et al.* (1992) sont les deux protocoles d'extraction qui ont été déterminés pour isoler l'ADN nécessaire aux essais de PCR et à la mise au point de la technique de détection

microbienne. La durée des isolements d'ADN microbien totalisait environ 5,5 heures, pour l'extraction la plus rapide, soit celle basée sur la technique de Tsai et Olson (1991), et de 20,5 heures pour celle basée sur la technique de Trevors *et al.* (1992). Il faut toutefois mentionner qu'une incubation de 16 heures, pouvant être réalisée durant la nuit, augmente considérablement le temps total nécessaire à une extraction par le protocole de Trevors *et al.* (1992). Cependant, dans un cas comme dans l'autre, ce n'est qu'un maximum de 30 minutes qui fut requis pour la totalité des manipulations nécessaires à l'extraction complète d'ADN des microorganismes du sol. Les rendements offerts par les deux techniques sélectionnées sont d'ailleurs comparables aux meilleurs rendements pouvant être cités dans les publications et ce, tant à ce qui a trait à la taille des fragments d'ADN obtenus qu'à la quantité d'ADN récoltée. C'est pourquoi des extraits d'ADN isolés grâce à ces deux protocoles ont, après avoir été purifiés, servi aux expériences de PCR.

### **3.3.2 Les contaminants des extraits bruts d'ADN isolés des microorganismes du sol et l'analyse des résultats obtenus des trois méthodes utilisées pour leur purification**

La «Polymerase Chain Reaction» a été choisie comme l'outil principal de la technique de détection microbienne développée dans ces travaux. Cependant, les prélèvements d'ADN microbien nécessaires aux détections entraînent une coextraction d'une forte concentration de substances humiques provenant du sol. Les substances humiques, qui constituent moins de 10% du poids total du sol (Atlas et Bartha, 1993), sont en effet les contaminants les plus représentés dans les extraits d'ADN des microorganismes du sol (Dijkmans *et al.*, 1993; Higuchi, 1992; Tebbe et Vahjen, 1993). Les acides humiques et les acides fulviques sont les deux catégories de polymères irréguliers qui constituent majoritairement les substances humiques omniprésentes dans le sol (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Atlas et Bartha, 1993; Metting, 1993; Smith *et al.*, 1993; Thurman *et al.*, 1988). Ces composés non désirés extraits avec l'ADN se révèlent des contaminants dont il faut se débarrasser pour être en mesure d'effectuer des détections

microbiennes à l'aide de la méthode préconisée dans ces travaux. En effet, les substances humiques, même présentes en quantité infime, peuvent causer des résultats faux-positifs et inhiber l'ADN polymérase *Taq* (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Higuchi, 1992; Muller-Wegener, 1988; Smalla *et al.*, 1993; Steffan *et al.*, 1988; Straub *et al.*, 1995; Tebbe et Vahjen, 1993; Tsai *et al.*, 1993; Tsai et Olson, 1992a, 1992b). Les effets néfastes majeurs causés par les substances humiques sur l'enzyme clé de la PCR sont surtout attribuables aux acides humiques qui peuvent absorber l'enzyme ou causer des interférences chimiques ou allostériques avec son site actif (Muller-Wegener, 1988). Les acides humiques peuvent aussi chélater et lier des cations bivalents, tel le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$ , les empêchant d'être utilisés comme cofacteurs par l'ADN polymérase *Taq* (Muller-Wegener, 1988; Tsai et Olson, 1992b). De plus, parallèlement aux substances humiques, plusieurs autres composés, dont des métaux lourds et des colloïdes, sont coextraits lors des isollements de l'ADN des microorganismes du sol et peuvent nuire aux réactions de PCR (Abbaszadegan *et al.*, 1993; DeLeon *et al.*, 1991; Higuchi, 1992; Muller-Wegener, 1988; Straub *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 1993). Les ions métalliques, qui représentent des agents inhibiteurs de l'ADN polymérase *Taq*, peuvent, eux aussi, mener à des amplifications non spécifiques en réduisant la spécificité des amorces lors des réactions de PCR (Saiki *et al.*, 1988).

Puisque les nombreuses substances contaminantes présentes dans les extraits d'ADN sont nuisibles aux détections microbiennes par PCR, un système pouvant les éliminer ou diminuer efficacement leur concentration se devait d'être élaboré. Même si les diminutions considérables des concentrations de contaminants obtenues par de simples dilutions peuvent mener à des résultats d'amplification intéressants (Tsai et Olson, 1992a; Volossiuk *et al.*, 1995), c'est l'option d'une mise au point de techniques de purification complètes qui a été préconisée dans ces travaux. Effectivement, il a été démontré qu'avec une approche ne présentant que des dilutions, la sensibilité de détection diminue à cause de la moins forte présence de séquences d'ADN cibles dans le milieu que provoquent ces traitements (Tsai et Olson, 1992a, 1992b). Un processus de purification ne diminuant pas la sensibilité de la PCR a donc été élaboré dans ces

travaux.

De nombreuses techniques de purification sont proposées dans les publications, comme les chromatographies sur colonnes d'hydroxyapatite ou les ultracentrifugations avec gradient de densité sur chlorure de césium (CsCl), mais la plupart d'entre elles sont complexes et de longue durée. Ces techniques ne permettent également que la purification d'un petit nombre d'échantillons à la fois et elles conduisent fréquemment à d'importantes pertes d'ADN (Tebbe et Vahjen, 1993). De plus, étant donné la difficulté d'élimination des substances humiques, des concentrations notables de ces composés ont pu être mesurées et ce, même par suite de purifications avec ces techniques complexes (Steffan *et al.*, 1988). Pour ces motifs, le choix de la méthode de purification utilisée dans ces travaux ne s'arrêta pas sur des techniques de ce type. En effet, le processus de purification recherché se devait d'être simple, efficace et assez rapide, de façon à pouvoir être utilisé sur une base routinière. De plus, il devait permettre de purifier une grande quantité d'échantillons en une courte période de temps et ce, sans mener à une trop grande perte d'ADN. C'est pourquoi la purification par chromatographie sur colonne de Sephadex G-200 fut sélectionnée pour être le complément de la première étape de purification classique par solvants. Cette chromatographie s'est d'ailleurs avérée comme l'une des plus efficaces parmi les méthodes de purification rapportées pour l'élimination des substances humiques et des autres contaminants contenus dans des extraits d'ADN isolés des microorganismes du sol (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Degrange et Bardin, 1995; Straub *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 1993; Tsai et Olson, 1992b). Enfin, une méthode de purification supplémentaire a été expérimentée, puisque d'une part la technique de détection microbienne développée dans ces travaux se devait d'être efficace pour des sols amendés par des boues résiduaires, et d'autre part parce que les extraits d'ADN microbien provenant de ces sols risquaient de contenir une quantité plus grande de métaux lourds et de d'autres contaminants à cause de la très forte concentration de ceux-ci dans les boues. En effet, la chromatographie sur la résine échangeuse d'ions Chelex-100 fut déterminée pour être la troisième étape de



purification. Cette matrice fut choisie parce que, parmi les purifications rapportées dans les publications, celles qui combinaient des résines Sephadex et Chelex-100 se révélaient toutes de très efficaces méthodes pour purifier des extraits d'ADN des microorganismes du sol en vue de détections microbiennes par PCR (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Straub *et al.*, 1994, 1995).

À la lumière des observations faites à partir des extraits d'ADN ayant subi les purifications, il semble que celles-ci aient été efficaces pour débarrasser les échantillons des substances pouvant inhiber les réactions de PCR. En effet, on a pu remarquer, dès la première étape de purification, soit celle par solvants organiques (phénol/chloroforme), une perte significative des contaminants présents dans les extraits d'ADN. Cependant, il a été possible de constater immédiatement que cette purification, qui était surtout utile pour enlever les nombreuses protéines des échantillons, ne pouvait rendre les extraits d'ADN suffisamment purs pour permettre des amplifications fiables par PCR. Par contre, la purification par Sephadex G-200 a permis d'obtenir des extraits d'ADN limpides en enlevant la totalité des substances de couleur qui étaient visibles avant la filtration et ce, dans presque tous les extraits d'ADN obtenus par la méthode de Tsai et Olson (1991) ou par celle de Trevors *et al.* (1992). Effectivement, il n'y a que quelques extraits, qui avaient tous été obtenus grâce à la méthode proposée par Tsai et Olson (1991), qui arboraient une légère teinte jaune pâle après leur filtration à travers le Sephadex G-200. Il n'est toutefois pas surprenant que les extraits d'ADN isolés par la technique de Trevors *et al.* (1992) n'aient jamais eu cette légère teinte jaune puisque ces extraits étaient déjà beaucoup plus pâles que les extraits obtenus de tous les autres protocoles à l'étude. C'est la deuxième purification par chromatographie, soit celle sur résine Chelex-100, qui a permis aux extraits qui n'étaient pas encore, de devenir limpides. Quant à eux, les échantillons ayant été filtrés par le Chelex-100 qui étaient déjà très clairs, ont sans doute été purifiés d'avantage mais sans que des différences visibles aient été dénotées. De plus, suite à l'analyse des extraits d'ADN purifiés, aucune perte notable d'ADN n'a pu être détectée par comparaison entre l'intensité des bandes d'ADN brut et celles d'ADN purifié lors d'une électrophorèse sur gel d'agarose (résultats non présentés). Par

conséquent, tous ces résultats semblent suggérer que l'opération phénol/chloroforme suivi du traitement Sephadex G-200/Chelex-100 soit un processus de purification permettant de se débarrasser efficacement des substances humiques et des autres contaminants pouvant inhiber la PCR.

### **3.3.3 Les détections et les différenciations de microorganismes par la PCR**

#### **3.3.3.1 L'analyse de l'efficacité des méthodes de purification utilisées, la détermination du seuil minimal de détection et la validité de la technique de détection microbienne développée**

Les résultats obtenus permettent tout d'abord d'affirmer que les purifications chromatographiques effectuées sur les extraits d'ADN ont permis d'amplifier efficacement l'ADN cible des cellules d'*E. coli* qui avaient été inoculées dans les sols. Dans toutes les amplifications par PCR, la spécificité des détections de cellules d'*E. coli* réalisées à l'aide des amorces UAL-754 et UAR-900 fut prouvée par l'absence d'une amplification générée par la solution qui servait de témoin négatif. On peut donc confirmer que l'autoclavage effectué sur les sols a tué les cellules et dégradé suffisamment leur ADN pour qu'il ne puisse être détecté par la méthode expérimentée dans ces travaux et que, par conséquent, les amplifications de ces expériences ont de fait été réalisées à partir d'ADN provenant des cellules cibles inoculées dans les sols après qu'ils aient été autoclavés. La sensibilité de détection microbienne dans le sol n'ayant pas reçu de boues résiduaires, fut donc déterminée comme étant de 500 cellules par gramme de sol. Il a effectivement été possible de détecter d'une façon efficace et routinière la présence d'*E. coli* dans le sol lorsque cette bactérie était en concentration supérieure ou égale à 500 cellules/g de sol. La limite de détection de ces travaux est satisfaisante, car elle paraît comparable ou avantageuse par rapport aux sensibilités de détection obtenues de méthodes semblables effectuées par d'autres auteurs. Par exemple, on rapporte que Degrange et Bardin

(1995) ont pu détecter 100 cellules de *Nitrobacter*/g de sol sec, que Tsai et Olson (1992a) ont obtenu une sensibilité de 500 *E. coli*/g de sol, que Picard *et al.* (1992) pouvaient détecter la présence d'*Agrobacterium tumefaciens* lorsque sa concentration était de 10000 cellules/g de sol et que le seuil minimal de détection obtenu par Smalla *et al.* (1993) était de 1000 *Pseudomonas fluorescens*/g de sol. Il y a toutefois quelques publications qui citent de meilleures sensibilités, comme celle de Tsai et Olson (1992b), qui rapporte un seuil minimal de détection de 70 *E. coli*/g de sol. Cependant, quoiqu'elles puissent représenter une bonne base de comparaison, les sensibilités de détection retrouvées dans les publications doivent faire l'objet d'une attention particulière parce que la réelle efficacité des détections peut différer d'une étude à l'autre. Effectivement, pour déterminer le vrai potentiel d'une détection microbienne, il faut identifier le nombre de copies de la séquence ciblée contenues dans les cellules dont on veut vérifier la présence. Si on regarde l'étude rapportant un seuil minimal de détection de 70 *E. coli*/g de sol (Tsai et Olson, 1992b), les amorces sélectionnées codaient pour le fragment d'un gène d'ARN ribosomal 16S pouvant être retrouvé en sept copies dans une seule cellule d'*Escherichia coli* (Tsai et Olson, 1992a, 1992b). Par conséquent, c'est 490 copies de la séquence cible, soit 70 cellules contenant 7 copies chacune, qui devaient être présentes dans un gramme de sol pour qu'une amplification positive puisse être détectée dans les expériences menées par Tsai et Olson (1992b). Cette efficacité de détection est donc comparable à celle dont nos travaux font état, puisque les séquences ciblées par les amorces utilisées ici n'étaient présentes qu'en une seule copie dans chaque cellule d'*E. coli* (Bej *et al.*, 1991a; Jefferson *et al.*, 1986). Par ailleurs, dans nos travaux, si l'on considère que les 10 µl de la solution d'ADN utilisée pour la réaction de PCR n'étaient en réalité qu'une fraction correspondante à 1/100 de l'extrait contenant l'ADN des 500 cellules cibles, cette méthode a permis la détection de cinq séquences cibles d'ADN, ce qui représentait cinq cellules d'*E. coli*. De plus, lorsque l'on compare les différents résultats publiés, dont les quatre cités ci-haut, en fonction de l'efficacité d'amplification rapportée sur le nombre de copies de la séquence cible en présence, la sensibilité obtenue dans ces travaux-ci se classent parmi les meilleures.

Parmi les résultats récoltés, on peut noter est que le seuil minimal de détection, de 500 cellules d'*E. coli*/g de sol non amendé par des boues, a été obtenu aussi bien par les extraits d'ADN ayant subi une purification complète que par ceux n'ayant pas été purifiés par la résine de Chelex-100. Ce résultat suggère que la purification sur Chelex-100 serait superflue pour des détections microbiennes dans des sols n'ayant pas reçu de boues résiduelles. En effet, ce traitement de purification supplémentaire n'a pas permis d'améliorer la sensibilité de la technique de détection pour des sols non amendés par des boues. Cette remarque semble en accord avec les expériences précédentes de détections microbiennes utilisant le Sephadex G-200 (Degrange et Bardin, 1995; Tsai *et al.*, 1993; Tsai et Olson, 1992b). Effectivement, aucune d'entre elles n'a nécessité une purification supplémentaire à celle réalisée sur la résine de Sephadex G-200 lorsque des détections de microorganismes dans un sol sans traitement particulier devaient être effectuées. Par conséquent, une purification par phénol/chloroforme suivie d'une filtration sur une colonne contenant une résine de type Sephadex G-200 s'avère un traitement suffisant pour permettre une détection microbienne fiable et sensible, et ce, à partir d'un extrait d'ADN isolé par les protocoles de Trevors *et al.* (1992) ou de Tsai et Olson (1991). En effet, quelle que soit la technique choisie parmi les deux méthodes d'extraction d'ADN sélectionnées, la limite minimale de détection bactérienne était la même. Cependant, étant donné que le protocole de Trevors *et al.* (1992) semblait, de par sa couleur, procurer des extraits d'ADN contenant moins de substances humiques, il fut utilisé pour le reste des travaux. Il est toutefois bon de mentionner qu'aucun résultat ne permet de conclure que la technique proposée par Tsai et Olson (1991) mènerait à des extraits procurant une efficacité de détection moindre que ceux obtenus par la méthode de Trevors *et al.* (1992). De plus, le protocole de Tsai et Olson (1991) serait celui à conseiller dans le cas d'une étude qui devrait s'effectuer le plus rapidement possible puisqu'il est, de loin, le plus rapide des deux.

En analysant les détections bactériennes réalisées dans les sols ayant subi des déversements de boues résiduelles, on se rend compte qu'elles diffèrent quelque peu de celles qui ont été

effectuées sur des sols qui n'en avaient pas reçu. En effet, il a été possible de constater que plus la quantité de boues ajoutée sur le sol était importante, moins la détection était sensible. Donc, mise à part le sol ayant reçu une quantité de boues équivalente à 25% de la dose maximale permise, qui permettait des amplifications aussi efficaces que celles des sols n'ayant pas subi de déversement, soit de 500 cellules d'*E. coli*/g de sol, les seuils minimaux de détection dans les sols amendés étaient considérablement plus élevés après l'ajout de boues. De cette façon, la limite de détection est passée à 1000 cellules d'*E. coli*/g de sol pour les détections réalisées sur des extraits d'ADN provenant du sol qui avait reçu la dose de boues maximale permise, et à 10000 cellules d'*E. coli*/g de sol pour celles ayant été effectuées sur de l'ADN qui était isolé du sol amendé avec une quantité de boues représentant 120% de la dose maximale permise. Par conséquent, la purification supplémentaire sur Chelex-100 était, dans ces cas, très justifiée. Celle-ci a effectivement permis aux détections de bactéries effectuées dans des sols qui avaient reçu des boues résiduelles, d'être beaucoup plus sensibles et même d'atteindre, excepté pour les détections effectuées dans les sols qui ont reçu plus de boues que la limite légale, 500 cellules d'*E. coli*/g de sol comme limite de détection. Le traitement des extraits par le Chelex-100 a donc permis à la technique développée dans ces travaux d'être comparable avec les meilleures techniques de détection de microorganismes dans le sol, dont quelques-unes ont été citées ci-haut. Par ailleurs, la nécessité d'utiliser la purification supplémentaire sur Chelex-100, pour des extraits d'ADN provenant de sols amendés par des boues, n'est pas étrangère aux études semblables précédemment rapportées. Ainsi, les études menées par Straub *et al.* (1994, 1995) ont toutes eu recours à ce type de résine échangeuse d'ion pour compléter l'élimination des acides humiques et, surtout, des métaux lourds toujours présents dans les extraits d'ADN. De cette façon, ils ont pu augmenter considérablement la sensibilité de leur technique de détection microbienne pour des sols amendés par des boues d'usine d'épuration des eaux. Donc, à la lumière des résultats obtenus, même si le seuil minimal de détection semblait déjà être à son meilleur dans le cas des détections réalisées sur de l'ADN provenant des microorganismes du sol amendés avec 25% de la charge maximum de boues, on peut suggérer la purification de tous les

extraits d'ADN par phénol/chloroforme, Sephadex G-200 et Chelex-100 lorsque ceux-ci proviennent de sols amendés avec des boues résiduelles et qu'ils sont destinés à une détection microbienne. De plus, il est possible de présumer, étant donné l'efficacité démontrée par les purifications utilisées dans cette étude, que les méthodes faisant partie de ces travaux seraient toutes aussi efficaces pour des détections microbiennes portant sur d'autres sols, amendés ou non par des boues résiduelles de différentes provenances.

Les résultats discutés ci-haut ont confirmé que la méthode de détection microbienne développée dans ces travaux est très efficace. Il serait toutefois intéressant d'effectuer d'autres détections bactériennes dans des sols ayant subi des inoculations variables de 250 à 500 cellules d'*E. coli*/g de sol. Par cette procédure, on pourrait vérifier si le seuil minimal de détection ne se situerait pas plutôt sous la barre des 500 séquences d'ADN cibles/g de sol. Néanmoins, même si tel n'est pas le cas, la sensibilité de détection obtenue dans ces travaux est déjà très satisfaisante. Parmi les tributaires de cette réussite, on peut mentionner les modifications apportées au cycle de PCR utilisé pour les amplifications. En effet, ces conditions de PCR, qui avaient été originellement proposées par Bej *et al.* (1991a), furent légèrement changées pour tenter de diminuer le seuil de détection minimal de la technique. Les deux changements importants qui ont probablement servi la cause en question, sont l'augmentation du nombre de cycles répétitifs de 25 à 40, de façon à rendre les faibles quantités d'ADN cible amplifiables en concentration suffisante pour qu'elles soient visibles après une migration sur gel, ainsi que l'ajout d'une étape d'incubation de 20 minutes à 72 °C, celle-ci étant utile pour compléter l'extension des brins d'ADN amplifiés. Cependant, en fonction de l'utilisation que l'on veut en faire, il serait toujours possible d'expérimenter quelques modifications à la technique pour vérifier si la sensibilité de celle-ci peut être améliorée. Parmi ces modifications, mentionnons l'ajout de cycles d'amplification supplémentaires ainsi que la combinaison de deux séries de réactions de PCR complètes. Néanmoins, ces opérations représentent de plus grands risques d'engendrer des amplifications non spécifiques lors des détections microbiennes (Smalla *et al.*, 1993). L'utilisation d'amorces

homologues à une séquence présente en plusieurs copies dans les cellules cibles est une des avenues intéressantes qui pourraient être expérimentées puisque, comme rapporté par Tebbe et Vahjen (1993), le plus grand nombre de séquences cibles dans chaque cellule permet d'améliorer la sensibilité d'une détection microbienne. De plus, l'ajout de la protéine 32 du gène T4 dans la solution de PCR constitue une autre option pour abaisser davantage la limite de détection de la méthode. En effet, Tebbe et Vahjen (1993) ont démontré qu'avec cette protéine, qui stabilise l'ADN simple-brin pendant la fixation des amorces sur celui-ci, il était possible d'augmenter considérablement la sensibilité d'une détection microbienne par PCR. Pour permettre que le seuil minimal de détection de la méthode développée ici soit encore plus bas, l'essai de plusieurs ADN Polymérase *Taq* devrait être effectué, de façon à déterminer laquelle est la plus efficace et la plus résistante aux acides humiques. Il a été rapporté que les enzymes servant à la PCR offerts par différents fabricants peuvent être plus ou moins résistants aux acides humiques par un facteur allant jusqu'à huit fois (Tebbe et Vahjen, 1993). Finalement, la sensibilité de détection peut également être améliorée en changeant la technique utilisée pour visualiser les résultats d'amplification, en l'occurrence ici, l'électrophorèse sur gel d'agarose. En effet, on pourrait vérifier les résultats en analysant les produits de la PCR par des méthodes plus sensibles, comme des hybridations moléculaires de type «Southern Blot», qui peuvent permettre de détecter des signaux plus faibles et ainsi augmenter le pouvoir d'une méthode de détection (Smalla *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1993). Cependant, ces manipulations représentent un travail plus fastidieux et plus coûteux.

En résumé, même s'il y aura toujours place à amélioration, on peut affirmer que la méthode mise au point dans ces travaux constitue un appareil de détection microbienne simple, rapide, reproductible et sensible.

### 3.3.3.2 La vérification de la présence possible de coliformes dans les sols amendés par des boues résiduelles

La présence de bactéries entériques (coliformes) dans les boues résiduelles représente l'une des inquiétudes majeures quant à leur valorisation sur des terres agricoles ou sylvicoles (Duff *et al.*, 1995; Ibiebele *et al.*, 1985; Ibiebele et Inyang, 1986; Itoyama *et al.*, 1990; Straub *et al.*, 1993). En effet, malgré les différents traitements opérés sur les boues, les coliformes restent parmi les organismes pathogènes les plus recensés dans celles-ci à cause de l'origine fécale d'une grande partie des intrants (Payment, 1993; Straub *et al.*, 1993). Par conséquent, si on considère que, selon les normes en vigueur au Québec (MENVIQ, 1991b), des quantités de boues supérieures à 6500 Kg/hectare peuvent être valorisées sur des sols, une grande quantité de coliformes peut être introduite dans l'environnement par une valorisation de ce résidu. Une telle contamination peut donc, à court terme, représenter un risque pour la santé des humains et des animaux qui côtoient ou visitent les sites d'épandage. De plus, à moyen et à long terme, cette contamination bactérienne introduite par les boues dans les terres amendées, peut se répandre à une vitesse aussi rapide qu'un mètre par jour (Bouwer *et al.*, 1974), dans le sol en surface ainsi qu'en profondeur et même être transportée, via l'irrigation, jusqu'à la nappe phréatique (Bouwer *et al.*, 1974; Craun, 1984; Vasseur *et al.*, 1996). La présente étude visait donc à vérifier, de façon préliminaire et générale, si les sols ayant subi un épandage de boues contenaient toujours une concentration notable de coliformes six mois après l'amendement. Pour ce faire, des détections bactériennes par PCR ont été effectuées sur des échantillons de sols qui avaient reçu différentes doses de boues d'épuration. Ce type de méthode de détection spécifique et sensible, qui s'est déjà montrée très efficace pour ce genre d'étude (Bej *et al.*, 1990, 1991a; Josephson *et al.*, 1991; Mahbubani *et al.*, 1990a; Pillai *et al.*, 1991; Tsai *et al.*, 1993), a été choisie pour sa simplicité et parce que les pathogènes faisant l'objet de la détection peuvent être viables dans le sol, mais non cultivables en laboratoire. De plus, certains d'entre eux pourraient mourir entre le temps d'échantillonnage et le temps d'énumération (Roszak et Colwell, 1987). C'est pourquoi la PCR



fut déterminée comme l'outil principal pour les détections de cette étude. Il est à noter que les réactions furent réalisées sur des extraits d'ADN des microorganismes du sol obtenus par le protocole de Trevors *et al.* (1992) et purifiés par le processus de purification complet développé dans cette étude. De plus, il faut mentionner que pour ces expérimentations, les échantillons de sol furent récoltés immédiatement avant les extractions d'ADN, puisqu'il a été démontré qu'une conservation à 4°C pouvait faire baisser sévèrement la population de bactéries vivantes du sol et ce, même lorsque la conservation est de courte durée (Josephson *et al.*, 1993).

Les résultats obtenus au moyen des détections par PCR confirment la présence de coliformes dans les sols amendés avec une quantité de boues plus grande ou équivalente à la dose maximale permise (MENVIQ, 1991b) et ce, six mois après que les sols en question aient reçu les boues résiduelles. En effet, en considérant le seuil minimal de détection de la technique lorsque les amorces UAL-754 et UAR-900 sont utilisées, il est possible de déduire qu'il y avait une concentration minimale de 500 séquences d'ADN cibles/g de sol dans chaque terreau où des détections bactériennes positives furent constatées. Toutefois, il est bon de mentionner qu'une partie du signal positif peut avoir été provoqué par une amplification d'ADN cible qui était contenu dans des cellules mortes ou qui se retrouvait sous forme libre dans le sol. En effet, quoique l'ADN libéré dans le sol est habituellement dégradé rapidement, il a été rapporté que des fragments de génomes relâchés dans le sol après la mort de leurs cellules hôtes pouvaient être protégés contre une dégradation rapide lorsqu'ils se liaient à des particules de sable, d'argile ou à des colloïdes (Khanna et Stotzky, 1990; Lorentz et Wackernagel, 1987; Ogram *et al.*, 1987; Paget *et al.*, 1992). Cependant, comme 500 copies d'ADN cibles devaient être présentes dans un gramme de sol pour que la méthode utilisée puisse signaler une détection positive, on peut avancer que même si certaines séquences d'ADN cibles étaient situées sur des fragments génomiques libres dans le sol, plusieurs autres devaient sûrement provenir de cellules vivantes. Par conséquent, on peut se permettre d'affirmer que les signaux positifs de détection constatés dans ces travaux indiquaient bien que des cellules cibles vivantes étaient présentes dans les sols

en question. Cependant, même si cette déduction paraît logique et fort probable, il est vrai que la distinction entre les cellules viables et non viables représente toujours une des principales lacunes des détections régulières réalisées à l'aide de la PCR. Toutefois, de plus en plus de techniques basées sur la PCR permettent d'effectuer des détections spécifiques de cellules vivantes (Bej *et al.*, 1991b; Mahbubani *et al.*, 1991). La plupart des techniques de détections offrant cette possibilité utilisent des amorces spécifiques à un ARNm des cellules faisant l'objet des détections. Le principe soutenant cette approche est que la majorité des ARNs messagers microbiens ont des demi-vies très courtes, soit de l'ordre de deux minutes ou moins (Belasco et Higgins, 1988; Josephson *et al.*, 1993), ce qui signifie qu'un signal positif de détection indique que l'échantillon étudié contenait des cellules viables quelques instants avant l'extraction d'ADN (Bej *et al.*, 1991b; Josephson *et al.*, 1993). Par conséquent, l'utilisation de telles amorces dans la méthode de détection développée dans ces travaux serait une option intéressante à considérer. Par contre, cela représente un choix difficile puisque, après une telle modification, on peut s'attendre à obtenir des détections moins efficaces, car ce sont des sensibilités plus faibles, de l'ordre de 1000 cellules/g de sol, qui furent obtenues lorsque des amorces spécifiques à une séquence d'ARNm étaient employées (Mahbubani *et al.*, 1990b). Cet inconvénient est probablement provoqué par la faible efficacité d'extraction et de préservation de l'ARNm (Bej *et al.*, 1991b).

Une autre des limitations propres à la méthode de détection utilisée dans cette étude est que les résultats obtenus par celle-ci sont qualitatifs ou, au mieux, semi-quantitatifs. En effet, grâce aux résultats obtenus à l'aide de la technique préconisée dans ces travaux, il est impossible de déterminer le nombre exact de cellules cibles détectées dans le sol. Toutefois, la technique sélectionnée pour réaliser les détections était tout de même très adéquate en égard aux objectifs poursuivis par cette étude préliminaire. En effet, cette technique permettait d'effectuer des détections bactériennes fiables ainsi qu'une évaluation des concentrations de coliformes présents dans les sols à l'étude. C'est pourquoi des techniques de quantification, comme l'évaluation du

nombre de cellules cibles à l'aide de standards préalablement préparés (Degrange et Bardin, 1995; Picard *et al.*, 1992) ou l'énumération bactérienne basée sur des méthodes compétitives (Gilliland *et al.*, 1990a; Lee *et al.*, 1996; Zachar *et al.*, 1993), auraient été superflues dans cette étude et ne furent pas considérées pour faire partie du protocole expérimental de ces travaux. Ainsi, comme mentionné ci-haut, il a été possible d'effectuer une approximation du nombre de coliformes présents dans les sols par suite des détections bactériennes par PCR. Ceci a pu être réalisé de deux façons différentes et complémentaires. La première, qui permet d'évaluer l'importance relative du nombre de coliformes que contenaient les sols amendés et dans lesquels des détections positives ont été constatées, consiste en une comparaison entre les résultats de PCR ayant subi l'électrophorèse sur le gel d'agarose. En effet, plus il y a de séquences d'ADN cibles dans le milieu réactionnel, plus la concentration des produits amplifiés est considérable et, par conséquent, plus la bande d'ADN visualisée sur le gel est importante. Ainsi, après la comparaison des bandes obtenues dans le cas des deux détections bactériennes positives, on peut conclure qu'après six mois, la concentration de coliformes était plus grande dans le sol qui avait reçu une quantité de boues représentant 120% de la dose maximale permise (MENVIQ, 1991b) que dans le sol qui avait subi un amendement équivalent à la limite maximale de valorisation légale. Cette observation ne va pas à l'encontre de nos attentes, puisqu'il apparaît normal qu'un sol ayant reçu 20% plus de boues qu'un autre, donc 20% plus de coliformes, contienne une population de bactéries entériques plus grande que celle du sol ayant subi un amendement moins considérable.

La connaissance de la sensibilité de la méthode de détection utilisée lorsque les oligonucléotides UAL-754 et UAR-900 servent d'amorces, est le deuxième outil pouvant nous permettre d'avoir une idée approximative du nombre de coliformes présents dans les sols de l'étude. En effet, en sachant que le plus faible taux de cellules cibles qui permettait une détection bactérienne était de 500/g de sol, on est assuré que les extraits ayant mené à l'obtention d'un signal positif contenaient une quantité supérieure ou équivalente à cette concentration minimale. Cependant,

dans cette étude, lorsqu'un signal positif n'a pu être visualisé suite à une détection par PCR, comme ce fut le cas pour la détection réalisée sur l'extrait d'ADN provenant du sol n'ayant été amendé que par une quantité de boues représentant 25% de la dose maximale permise (MENVIQ, 1991b), on ne peut affirmer qu'aucun coliforme n'était présent dans l'échantillon de sol en question. La seule conclusion que l'on peut tirer d'un tel résultat est qu'il y avait moins de 500 cellules cibles dans chacun des grammes de ce terreau. De plus, comme les amorces utilisées ne permettaient l'amplification spécifique que des cellules d'*E. coli* et de celles de certaines espèces appartenant au genre *Shigella* (Bej *et al.*, 1991a), il est possible que d'autres bactéries entériques, faisant partie d'espèces moins fréquemment retrouvées dans les boues qu'*E. coli*, aient été présentes dans les sols amendés, sans que nous puissions les détecter. Il y a donc une légère probabilité qu'une faible concentration de bactéries fécales ait été présente dans le sol qui a reçu la dose de boues équivalent à 25% de la dose de valorisation maximale (MENVIQ, 1991b) et ce, même si aucun signal de détection positif n'a pu être visualisé. Cependant, il est impossible qu'une importante concentration de coliformes ait été présente dans ce sol parce que *E. coli* est un des coliformes les plus représentés dans les boues résiduaire (MENVIQ, 1991b; Duff *et al.*, 1995) et que la technique de PCR utilisée pouvait les détecter efficacement. Par ailleurs, puisque des bactéries entériques appartenant à d'autres espèces ne pouvaient être détectées par la paire de sondes moléculaires utilisée dans ces travaux et que, à elles seules, les cellules d'*E. coli* et de *Shigella* sp. étaient présentes en quantité supérieure ou égale à 500/g de sol, on peut conclure qu'après six mois, la concentration des coliformes totaux dans les sols qui avaient reçu une quantité de boues équivalente à la dose maximale permise (MENVIQ, 1991b) pouvait être considérablement supérieure à 500 bactéries/g de sol. De plus, lorsque l'on considère l'importance des bandes d'amplification en présence, on constate que cette concentration semble augmenter de façon proportionnelle avec la dose de boues ajoutée sur le sol. Cette constatation, quoique inquiétante, est conforme à celle de quelques études semblables. En effet, Burge et Marsh (1978) rapportent que des coliformes et des streptocoques fécaux étaient toujours présents dans un sol amendé par des boues résiduaire après 77 jours,

alors que Vasseur *et al.* (1996) citent que, après une application de boues sur des sols selon les normes en vigueur au Québec (MENVIQ, 1991b), des coliformes étaient toujours fortement présents, avec une concentration supérieure à 10000 ufc/g de sol dans certains des sols étudiés et ce, même après une période de postvalorisation de deux ans.

À la lumière des résultats de cette étude, on peut constater que même si les normes Québécoises (MENVIQ, 1991b) concernant la valorisation des boues sont respectées, la fertilisation agricole ou sylvicole avec ce résidu peut représenter des risques inhérents à la contamination des sols et à la santé humaine. Par conséquent, l'interdiction d'accès au sites amendés pour une période d'un an, qui est présentement suggérée (MENVIQ, 1991b), devrait rester en vigueur. De plus, une vérification pour s'assurer de l'absence de pathogènes dans les sols devrait être effectuée avant de rendre le site accessible à nouveau. Finalement, étant donné la situation inquiétante rapportée par cette étude préliminaire, de plus amples études concernant les valorisations de boues résiduaires devraient être entreprises et ce, avec une gamme de doses de boues valorisées plus complète ainsi qu'une période de suivi plus longue. Ces études ultérieures devraient toutefois être effectuées en milieux naturels, car ceux-ci comportent de nombreux facteurs ayant démontré leur influence sur le comportement et la survie des coliformes dans les sols hôtes. De ces variables, les principales à considérer sont : le type de boues valorisées et sa composition, la saison pendant laquelle les amendements sont apportés, la température et les conditions climatiques, le degré d'humidité et le pH du sol, la matière organique et les nutriments contenus dans le sol, le relief du terrain ainsi que la communauté microbienne et la composition du sol ayant été amendé (Burge et Marsh, 1978; Ibiebele *et al.*, 1985; Itoyama *et al.*, 1990; McBride, 1995; MENVIQ, 1991a, 1991b; Parr *et al.*, 1993; Straub *et al.*, 1993; Vasseur *et al.*, 1996).

### **3.3.3.3 Les détections et la différenciation de certaines bactéries du genre *Streptomyces***

Les bactéries du genre *Streptomyces*, qui constituent une des subdivisions taxonomiques des

actinomycètes, sont des microorganismes filamenteux à Gram positif présents en abondance dans le sol. Parmi ceux-ci, certains représentent des agents phytopathogènes importants. La gale commune de la pomme de terre, qui peut engendrer de considérables pertes économiques dans l'est du Canada (Lawrence, 1964), représente l'une de ces pathologies qui sont causées par des espèces de *Streptomyces*. Toutefois, même si il a été confirmé que *Streptomyces* est impliqué dans la propagation et le développement de cette maladie de la pomme de terre, il y a toujours une confusion en ce qui a trait à l'identité des souches bactériennes qui représentent la totalité des agents causals de cette infection. Effectivement, il fut démontré de différentes façons que de nombreux organismes du genre *Streptomyces* impliqués dans la progression de la gale commune de la pomme de terre montraient toutes sortes de différences majeures avec les caractéristiques de *S. acidiscabies* et de *S. scabies*, cette dernière étant l'espèce prédominante associée à cette maladie (Archuleta et Easton, 1981; Doering-Saad *et al.*, 1992; Faucher *et al.*, 1992; Goyer *et al.*, 1996; Lambert et Loria, 1989a, 1989b). De plus, des études rapportent que certaines souches de *S. scabies* ont des génomes très différents entre elles, ce qui suggère qu'au moins deux groupes de souches bactériennes génétiquement distincts seraient inclus dans l'espèce *S. scabies* (Goyer *et al.*, 1996; Healy et Lambert, 1991; Paradis *et al.*, 1994). D'autres souches de *Streptomyces* pouvant causer la gale commune de la pomme de terre n'appartiennent pas aux espèces *S. scabies* et *S. acidiscabies* (Goyer *et al.*, 1996; Faucher *et al.*, 1995). Parmi ces autres souches bactériennes, on retrouve au Québec les souches de *S. caviscabies* (Goyer *et al.*, 1996).

Les principaux objectifs visés par cette partie des travaux étaient de trouver un moyen complémentaire pour permettre de confirmer que les souches de *S. scabies* et de *S. caviscabies* sont réellement différentes les unes des autres et, si possible, de déterminer une technique simple et rapide pour pouvoir les distinguer de façon efficace. Pour ce faire, la PCR, une technique de plus en plus utilisée comme outil taxonomique pour différencier les souches parentes de bactéries du sol (DeBruijn, 1992; Judd *et al.*, 1993; Louws *et al.*, 1994; Simonet *et al.*, 1991),

fut la méthode utilisée. Il s'agissait donc de sélectionner des amorces qui permettraient d'obtenir des patrons d'amplification spécifiques et différents pour les microorganismes à différencier. Les amorces choisies pour les expériences de PCR sont la paire MSTM-1L/MSTM-2C, qui a été créée dans ces travaux, et la paire pA/pH\* proposée par Edwards *et al.* (1989). C'est grâce à ces deux paires d'amorces que les essais de détection dans le sol et de différenciation de souches de *S. scabies* et de *S. caviscabies* furent effectués.

Les expériences de PCR réalisées avec les amorces pA et pH\* sur la totalité des souches de *Streptomyces* étudiées ont permis de constater que les patrons d'amplification ainsi obtenus étaient tous identiques ou ne comportaient que quelques légères différences entre eux. Par ailleurs, il faut mentionner que parmi les quelques différences mineures observées, rares sont celles qui étaient visualisées entre une souche de *S. caviscabies* et une souche de *S. scabies*. De plus, les bandes faiblement amplifiées qui représentaient une différence dans quelques-unes des migrations sur gel d'agarose n'étaient pas assez importantes pour constituer un élément distinctif pouvant servir à affirmer que certains patrons d'amplification étaient différents. Ces constatations permettent de déduire que les amorces rapportées par Edwards *et al.* (1989), catalysant l'amplification spécifique d'une séquence d'ADNr 16S, génèrent un produit de PCR quasi identique pour toutes les souches de *S. caviscabies* et *S. scabies* étudiées. Les patrons d'amplification résultant de ces souches sont aussi pratiquement les mêmes que ceux obtenus dans des travaux réalisés par Mehling *et al.* (1995) sur une trentaine d'espèces de *Streptomyces*. De plus, la bande d'environ 1,5 Kb qui constitue le fragment principal de ces amplifications a également été obtenue par Bruce *et al.* (1992) lorsque la même paire d'amorces fut utilisée dans des expériences de PCR sur de l'ADN d'*E. coli*. Par conséquent, une différence fiable par PCR entre les espèces *S. caviscabies* et *S. scabies* ou entre différentes souches appartenant à l'une ou l'autre des espèces étudiées semble impossible en utilisant les amorces pA et pH\*. Cependant, elles pourraient tout de même être d'une grande utilité car, une fois séquencé, le fragment amplifié par ces amorces pourrait conduire, comme ce fut le cas dans les travaux de Mehling *et*

*al.* (1995), à la confection de plusieurs sondes pouvant détecter spécifiquement des espèces de bactéries, dont celles du genre *Streptomyces*. Sinon, une des seules façons pouvant peut-être permettre de réussir des différenciations adéquates entre les deux espèces de *Streptomyces* étudiées grâce aux amorces pA/pH\*, serait d'effectuer, sur le fragment principal obtenu de la PCR, différentes digestions à l'aide d'enzymes de restriction.

Les essais de PCR réalisés sur les 13 souches de *Streptomyces* étudiées à l'aide des amorces MSTM-1L et MSTM-2C ont, quant à eux, mené à des produits d'amplification dont certains différaient entre eux. Il faut toutefois prendre note qu'aucune des différences observées prenait place entre les patrons d'amplification générés à partir des six souches de *S. caviscabies*, puisqu'ils étaient tous identiques. La constatation fut cependant tout autre en ce qui a trait aux patrons d'amplification des souches de *S. scabies*. En effet, non seulement ceux-ci ne ressemblaient en rien aux patrons des souches de *S. caviscabies*, mais ils différaient aussi les uns des autres, ce qui indique que les souches de *S. scabies* forment un groupe plus hétérogène que *S. caviscabies*. De plus, les amplifications par PCR ont permis de polymériser quatre fragments d'ADN majoritaires lorsque les expériences étaient effectuées sur l'ADN des souches de *S. caviscabies* alors que, lorsqu'elles furent réalisées sur celui des souches de *S. scabies*, on ne pouvait en visualiser qu'un ou deux. Ceci permet de déduire que les séquences génétiques homologues aux amorces MSTM seraient moins représentées dans le génome de *S. scabies* que dans celui de *S. caviscabies*. Ces quelques constatations concernant les patrons d'amplification démontrent donc, d'une façon évidente, que les souches appelées *S. caviscabies* forment un groupe taxonomique qui semble homogène et génétiquement différent de l'espèce *S. scabies*. Ces travaux permettent alors de soutenir les conclusions apportées par Healy et Lambert (1991), qui avaient rapporté que plusieurs souches classées dans l'espèce *S. scabies* montraient beaucoup plus de diversité génétique que les espèces conventionnelles, ainsi que par les travaux de Faucher *et al.* (1995), dans lesquels il est démontré que des *Streptomyces* pathogènes, présentes dans les lésions profondes de pomme de terre atteintes de la gale commune, formaient un groupe



homogène différent de *S. scabies* et de *S. acidiscabies*. Les résultats de cette recherche permettent aussi d'appuyer les travaux de Paradis *et al.* (1994) et de Goyer *et al.* (1996) qui, grâce à plusieurs types d'expérimentations, dont des hybridations ADN-ADN, ont certifié tour à tour que la population de *S. scabies* est composée de trois différents groupes de microorganismes et que pour ces bactéries, une nouvelle subdivision taxonomique, appelée *S. caviscabies*, devait être adoptée. Par ailleurs, le protocole de cette recherche permet, grâce à la PCR, de distinguer les souches des deux espèces de façon efficace et plus rapide que par hybridation ADN-ADN. Effectivement, même si les amplifications peuvent quelques fois mener à des résultats légèrement différents de ceux obtenus de façon routinière, les patrons d'amplification des souches de *S. caviscabies* restent tout de même toujours identiques entre eux et clairement différents de ceux des souches de *S. scabies*. Donc, grâce à la paire d'amorces MSTM, la technique de PCR utilisée peut constituer un excellent outil, basé directement sur le génome, pour différencier de façon fiable, simple, rapide et reproductible les souches appartenant à *S. scabies* de celles appartenant à *S. caviscabies*. De plus, les amorces MSTM-1L et MSTM-2C pourraient probablement permettre de distinguer les souches de *Streptomyces* étudiées des autres espèces bactériennes. Cependant, pour en vérifier la faisabilité, chaque étude comprenant d'autres souches bactériennes que celles ayant fait partie de ces travaux devrait être expérimentée de façon unique et indépendante, car il est possible que les patrons d'amplification générés à partir d'ADN génomique provenant de d'autres bactéries puissent ressembler à ceux qui ont été obtenus lorsque les réactions de PCR étaient réalisées sur l'ADN de *S. caviscabies* et de *S. scabies*.

La troisième partie de cette section comprenait des expériences visant la détection de *Streptomyces* dans des échantillons d'ADN extrait des microorganismes du sol. Ces essais se sont malheureusement avérés beaucoup moins prometteurs que ceux qui portaient sur la différenciation des souches de *S. scabies* et de *S. caviscabies*, puisque les deux paires d'amorces expérimentées n'ont pas présenté des résultats confirmant qu'elles pourraient être utiles dans des

détections de bactéries du genre *Streptomyces*. Effectivement, si on considère les détections bactériennes réalisées avec les sondes pA et pH\*, on peut facilement en déduire que la confirmation de la présence de cellules cibles dans l'extrait d'ADN microbien n'était pas spécifique à des bactéries du genre *Streptomyces*. Il est en effet assuré que cette paire d'amorce a amplifié l'ADN de plusieurs espèces de bactéries, puisque ces oligonucléotides étaient homologues à une séquence d'ADNr 16S fortement conservée chez les eubactéries (Bruce *et al.*, 1992; Edwards *et al.*, 1989; Mehling *et al.*, 1995). De plus, Bruce *et al.* (1992) ont démontré qu'un signal de détection positif identique à celui visualisé dans ces travaux, soit un fragment d'environ 1,5 Kb, pouvait être obtenu au moyen d'amplifications par PCR réalisées à l'aide des amorces pA et pH\* sur de l'ADN d'*E. coli* ou sur de l'ADN extrait des microorganismes provenant de sols, de sables et de sédiments. Par conséquent, même si ces amorces peuvent réaliser des amplifications à partir de l'ADN extrait des microorganismes de sol, elles ne représentent pas des sondes suffisamment spécifiques pour permettre l'amplification sélective de bactéries du genre *Streptomyces*. Pour ce qui est de la plus grande quantité de fragments synthétisée par la PCR, lorsque l'ADN était extrait par le protocole de Tsai et Olson (1991) par rapport à la quantité d'ADN générée à partir de la méthode de Trevors *et al.* (1992), on peut présumer que cette différence était imputable aux rendements respectifs de ces deux techniques d'extraction d'ADN. En effet, étant donné que les mêmes quantités de la solution d'ADN furent utilisées pour les réactions de PCR et comme le protocole de Tsai et Olson (1991) a permis de récolter une plus grande quantité d'ADN microbien que celui de Trevors *et al.* (1992), on peut déduire qu'il devait y avoir plus de séquences d'ADN cibles dans l'échantillon d'ADN obtenu par la méthode Tsai et Olson (1991) et que, par conséquent, c'est ce qui expliquerait la différence entre la quantité de matériel amplifié à partir de l'ADN obtenu des deux extraits.

En ce qui concerne les résultats des détections réalisées dans le sol grâce aux amorces MSTM-1L et MSTM-2C, ils ont permis de constater que celles-ci, tout comme les sondes pA et pH\*, n'ont pas mené à des patrons d'amplification clairs et distincts. En effet, les produits de PCR obtenus

lors de ces expérimentations, visualisés sous forme d'une traînée («smear») sur gel d'agarose, ne ressemblaient en rien à ceux obtenus lorsque la paire d'amorces MSTM fut utilisée pour l'amplification de l'ADN génomique des souches de *S. scabies* et de *S. caviscabies*. L'obtention de ces traînées, formées d'une multitude de fragments de différentes longueurs, est probablement due à la présence de d'autres séquences d'ADN homologues aux amorces MSTM dans les extraits d'ADN du sol. Ces séquences supplémentaires, qui devaient être présentes en une quantité ne permettant pas la polymérisation et l'émergence de fragments dominants, provenaient sans doute du matériel génétique de d'autres espèces du genre *Streptomyces* ou de celui d'autres espèces microbiennes. En effet, étant donné que la séquence des amorces a été déterminée à partir de deux régions conservées de gènes codant l' $\alpha$ -amylase produit par les bactéries du genre *Streptomyces* et que cette séquence peut être très semblable à celles codant pour l' $\alpha$ -amylase produit par de nombreux autres organismes (Long *et al.*, 1987; Nakajima *et al.*, 1986; Vigal *et al.*, 1991), il est fort possible que des séquences cibles amplifiées par le protocole de PCR utilisé provenaient de l'ADN de d'autres microorganismes présents dans l'échantillon de sol. Par conséquent, on doit se rendre à l'évidence que les amorces MSTM-1L et MSTM-2C ne sont pas suffisamment spécifiques pour effectuer, à l'aide de la PCR, une détection fiable et adéquate de bactéries du genre *Streptomyces* dans des échantillons contenant plusieurs microorganismes différents, comme ceux provenant du sol ou de d'autres milieux environnementaux.

## CONCLUSION

Les objectifs poursuivis dans ce travail étaient d'évaluer les impacts d'une fertilisation avec des boues résiduaires sur la microflore des sols, de mettre au point une technique de détection de microorganismes présents dans des échantillons de sol et de développer une technique de différenciation de certaines espèces de *Streptomyces*. Cette étude, faisant partie d'un sous-projet du projet multidisciplinaire STOPER, fut subdivisée en trois volets.

Le premier volet, qui constituait une étude visant à vérifier si des épandages de boues pouvaient engendrer une variation du nombre de bactéries du sol, a mené à la conclusion que, lorsque des valorisations de boues équivalentes à la dose de fertilisation maximale ont été effectuées, cela entraînait une augmentation considérable du nombre de bactéries du sol. De plus, dans ces cas, un délai supérieur à six mois était requis pour que la concentration des bactéries du sol revienne au même taux qu'un sol qui n'avait pas reçu de boues. Une suggestion pouvant être émise suite à cette étude est d'entreprendre d'autres travaux qui impliqueraient plusieurs des facteurs ignorés ici, afin mesurer plus précisément les impacts d'un amendement sur le nombre et la diversité des microorganismes d'un sol. De cette façon, il serait plus facile de déterminer s'il y a vraiment un danger pour la microflore des sols et pour l'ensemble de l'écosystème.

Le deuxième volet, qui visait à déterminer si des épandages de boues provoquaient une augmentation des populations bactériennes résistantes aux métaux lourds, a permis de constater que les fertilisations à l'étude n'ont provoqué aucune augmentation des populations bactériennes du sol résistantes au cadmium, au cobalt, au cuivre, au molybdène, au nickel, au sélénium et au zinc. On peut donc affirmer que des fertilisations, de la même importance que celles de cette étude, semblent représenter une option sécuritaire au point de vue de l'augmentation de la charge de métaux lourds ajoutée aux sols. Toutefois, aucune conclusion ne peut porter sur les normes de valorisation du MENVIQ, puisque les fertilisations étudiées dans ces travaux ne

représentaient pas les limites permises concernant la quantité de boues épandue et la concentration de métaux lourds présents dans les boues. Par conséquent, même si la situation est encourageante, elle mériterait d'être étudiée davantage en tenant compte des variables propres à un milieu naturel. Ainsi, plusieurs questions restant sans réponse seraient résolues et les conditions de valorisations de boues sécuritaires se préciseraient davantage.

Les expérimentations du troisième volet, qui avait trois sous-objectifs, ont tout d'abord mené au développement d'une technique de détection microbienne pour des échantillons de sols fertilisés ou non par avec boues résiduelles. Cette méthode de détection combine une extraction et une purification de l'ADN des microorganismes du sol, suivies par une détection des séquences d'ADN spécifiques de l'échantillon à l'aide d'une amplification par PCR. Pour la première étape de l'appareil de détection, qui est l'extraction de l'ADN des microorganismes du sol, deux protocoles ont été retenus parmi les cinq à l'étude. Il s'agit du protocole de Trevors *et al.* (1992), qui semble permettre de récolter les solutions d'ADN contenant le moins de contaminants, et celui de Tsai et Olson (1991), qui est l'extraction qui menait à la récolte d'ADN la plus importante. Ces deux protocoles ont mené à une efficacité ainsi qu'à une sensibilité de détection microbienne identique. Une fois les extraits bruts d'ADN purifiés par phénol/chloroforme et Sephadex G-200, pour ceux qui provenaient d'un sol non amendé par des boues, ou par phénol/chloroforme, Sephadex G-200 et Chelex-100, pour les extraits provenant de sols ayant reçu des boues résiduelles, ils étaient suffisamment débarrassés des substances humiques et des autres contaminants pouvant inhiber la PCR pour permettre des détections microbiennes efficaces. En effet, par suite de ces purifications, les essais de PCR réalisés avec les amorces UAL-754 et UAR-900 ont démontré qu'il était possible de détecter, d'une façon routinière, une concentration de 500 séquences d'ADN cibles par gramme de sol. Ces données permettent donc de conclure que la combinaison des procédures d'extraction, de purification et d'amplification par PCR qui a été mise au point dans ces travaux, constitue un appareil simple, rapide, reproductible et sensible pour détecter des microorganismes dans des sols qui ont été amendés

ou non avec des boues d'épuration. Par conséquent, ce procédé, qui permet l'analyse de plusieurs échantillons à la fois, peut représenter un outil de choix pour tout genre de suivi microbien dans des échantillons environnementaux. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle il fut utilisé pour l'étude constituant le deuxième sous-objectif de ce volet, qui portait sur la vérification de la présence possible de coliformes dans les sols amendés par des boues. Cette étude a permis de constater que des coliformes étaient toujours présents, en concentration supérieure à 500 cellules/gramme de sol, dans les terreaux ayant reçu la quantité de boues maximale permise et ce, même six mois après que les amendements aient été effectués. On peut donc conclure que, même si les normes québécoises concernant la valorisation des boues sont respectées, une fertilisation avec ce type de résidu peut représenter des risques pour la contamination des sols et pour la santé humaine. Par conséquent, des études plus exhaustives devraient vraiment être entreprises en milieux naturels pour s'assurer que les valorisations de ces résidus puissent être réalisées de la façon la plus sécuritaire possible. D'ici à ce que ces conditions soient déterminées, la prudence s'impose et l'interdiction d'accès aux sites valorisés devrait être maintenue jusqu'à ce qu'une vérification confirme l'absence de pathogènes dans les sols fertilisés. Finalement, la dernière partie du troisième volet visait la différenciation des souches de *S. scabies* et de *S. caviscabies* ainsi que la détection dans le sol de ces organismes phytopathogènes. Ces travaux ont confirmé que les membres de *S. caviscabies* forment un groupe taxonomique homogène et génétiquement différent de l'espèce *S. scabies*. Cette dernière ne s'est toutefois pas révélée une espèce homogène. De plus, même si les amorces pA et pH\*, se sont montrées inadéquates pour cette tâche, la PCR ainsi que les sondes MSTM-1L et MSTM-2C constituent un outil taxonomique simple, rapide et efficace pour distinguer les souches de *S. scabies* et de *S. caviscabies*. Cependant, les deux paires d'amorces expérimentées ne sont pas suffisamment spécifiques pour effectuer des détections fiables de *Streptomyces* dans des échantillons de sol.

## ANNEXES

ANNEXE A - BULLETINS D'ANALYSE DES BOUES RÉSIDUAIRES

ANNEXE B - BULLETINS D'ANALYSE DE LA TENEUR DES SOLS EN CERTAINS  
MÉTAUX LOURDS DISPONIBLES

## **ANNEXE A**

### **BULLETINS D'ANALYSE DES BOUES RÉSIDUAIRES**

- Tableau A-I. Normes recommandées et obligatoires établies par le MENVIQ concernant le contenu des boues résiduaires municipales.
- Tableau A-II. Bulletin d'analyse des boues résiduaires de la municipalité de Lac Mégantic utilisées pour la fertilisation du site amendé en 1989.
- Tableau A-III. Bulletin d'analyse des boues résiduaires de la municipalité de Lac Mégantic utilisées pour la fertilisation du site amendé en 1990.
- Tableau A-IV. Bulletin d'analyse des boues résiduaires de la municipalité de Lac Mégantic utilisées pour la fertilisation du site amendé en 1991.
- Tableau A-V. Bulletin d'analyse des boues résiduaires de la municipalité de Lac Mégantic utilisées pour la fertilisation du site amendé en 1992.
- Tableau A-VI. Bulletin d'analyse des boues résiduaires de la municipalité de Lac Mégantic utilisées pour les amendements en laboratoire en 1995.
- Tableau A-VII. Bulletin d'analyse des boues résiduaires de la municipalité de Princeville utilisées pour la fertilisation des sites amendés en 1993.
- Tableau A-VIII. Bulletin d'analyse des boues résiduaires de la municipalité de Princeville utilisées pour la fertilisation du site amendé en 1994.



**Tableau A-I. Normes recommandées et obligatoires établies par le MENVIQ concernant le contenu des boues résiduaires municipales.**

Paramètres des boues résiduaires (sur la base de la matière sèche)					
Matières sèches (%)		Métaux lourds (mg/kg m.s.)			
-					
Alcalinité (pH)		<div><div><i>N.</i></div><div><i>N. oblig.</i></div><div><i>recomm.</i></div></div>			
-					
Matières fertilisantes (mg/kg m.s.)					
Azote (N) total:	-	Arsenic (As):	15	30	
Azote ammoniacal:	-	Bore (B):	100	200	
Nitrites + Nitrates:	-	Cadmium (Cd):	10	15	
Phosphore (P) total:	-	Cobalt (Co):	50	100	
Phosphore (P) inorg.:	-	Chrome (Cr):	500	1000	
Potassium (K):	-	Cuivre (Cu):	600	1000	
Calcium (Ca):	-	Fer (Fe):	-	-	
Sodium (Na):	-	Magnésium (Mg):	-	-	
		Manganèse (Mn):	1500	3000	
		Mercure (Hg):	5	10	
		Molybdène (Mo):	20	25	
Composés organiques (mg/kg m.s.)					
		Nickel (Ni):	100	180	
		Plomb (Pb):	300	500	
		Sélénium (Se):	14	25	
<div><div><i>N.</i></div><div><i>N. oblig.</i></div><div><i>recomm.</i></div></div>					
BPC:	3	10	Zinc (Zn):	1750	2500

Source: Guide des bonnes pratiques de valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales du MENVIQ (1991b).

**Tableau A-II. Bulletin d'analyse des boues résiduelles de la municipalité de Lac  
Mégantic utilisées pour la fertilisation du site amendé en 1989.**

<b>Paramètres des boues analysés (sur la base de la matière sèche)</b>			
<b>Matières sèches</b> 2,47 %		<b>Métaux lourds</b> (mg/kg m.s.)	
<b>Alcalinité</b> pH : 6,5		Arsenic (As):	2,77
<b>Matières fertilisantes</b> (mg/kg m.s.)		Bore (B):	42,1
Azote (N) total: 85438		Cadmium (Cd):	0,42
Azote ammoniacal: 14090		Cobalt (Co):	6,45
Nitrites + Nitrates: 403		Chrome (Cr):	26,4
Phosphore (P) total: 15950		Cuivre (Cu):	413
Phosphore (P) 8163		Fer (Fe):	6200
inorg.: 8158		Magnésium (Mg):	3619
Potassium (K): 6702		Manganèse (Mn):	539
Calcium (Ca): 2372		Mercure (Hg):	1,80
Sodium (Na):		Molybdène (Mo):	10,2
<b>Composés organiques</b> (mg/Kg m.s.)		Nickel (Ni):	24,7
BPC: 0,47		Plomb (Pb):	47,1
		Sélénium (Se):	0,32
		Zinc (Zn):	190

Analyses effectuées par le MAPAQ de Rimouski (Québec, Canada) et de Rock Forest (Québec, Canada) ainsi que par le laboratoire d'environnement SM de Sherbrooke (Québec, Canada).

**Tableau A-III. Bulletin d'analyse des boues résiduaires de la municipalité de Lac  
Mégantic utilisées pour la fertilisation du site amendé en 1990.**

<b>Paramètres des boues analysés (sur la base de la matière sèche)</b>			
<b>Matières sèches</b> 2,47 %		<b>Métaux lourds</b> (mg/kg m.s.)	
<b>Alcalinité</b> pH : 5,9		Arsenic (As):	1,97
<b>Matières fertilisantes</b> (mg/kg m.s.)		Bore (B):	22,0
Azote (N) total:	87563	Cadmium (Cd):	1,00
Azote ammoniacal:	3268	Cobalt (Co):	3,43
Nitrites + Nitrates:	65	Chrome (Cr):	48,0
Phosphore (P) total:	22528	Cuivre (Cu):	513
Phosphore (P) inorg.:	11025	Fer (Fe):	7200
Potassium (K):	10825	Magnésium (Mg):	4500
Calcium (Ca):	8000	Manganèse (Mn):	473
Sodium (Na):	n.d.	Mercure (Hg):	0,29
<b>Composés organiques</b> (mg/Kg m.s.)		Molybdène (Mo):	3,7
BPC:	0,1	Nickel (Ni):	31,3
		Plomb (Pb):	33,3
		Sélénium (Se):	0,44
		Zinc (Zn):	293

Analyses effectuées par le MENVIQ (Québec, Canada).

**Tableau A-IV. Bulletin d'analyse des boues résiduelles de la municipalité de Lac  
Mégantic utilisées pour la fertilisation du site amendé en 1991.**

<b>Paramètres des boues analysés (sur la base de la matière sèche)</b>			
<b>Matières sèches</b> 2,11 %		<b>Métaux lourds</b> (mg/kg m.s.)	
<b>Alcalinité</b> pH : 6,3		Arsenic (As):	5,05
<b>Matières fertilisantes</b> (mg/kg m.s.)		Bore (B):	30,5
Azote (N) total:	65650	Cadmium (Cd):	1,00
Azote ammoniacal:	3310	Cobalt (Co):	7,5
Nitrites + Nitrates:	50	Chrome (Cr):	20,0
Phosphore (P) total:	18450	Cuivre (Cu):	864
Phosphore (P) inorg.:	10650	Fer (Fe):	7200
Potassium (K):	7355	Magnésium (Mg):	4500
Calcium (Ca):	8000	Manganèse (Mn):	1123
Sodium (Na):	n.d.	Mercuré (Hg):	2,15
<b>Composés organiques</b> (mg/Kg m.s.)		Molybdène (Mo):	15,0
BPC:	0,1	Nickel (Ni):	25,0
		Plomb (Pb):	54,5
		Sélénium (Se):	2,95
		Zinc (Zn):	336

Analyses effectuées par le laboratoire Génie sanitaire de l'Université de Sherbrooke (Québec, Canada).

**Tableau A-V. Bulletin d'analyse des boues résiduaire de la municipalité de Lac  
Mégantic utilisées pour la fertilisation du site amendé en 1992.**

<b>Paramètres des boues analysés (sur la base de la matière sèche)</b>			
<b>Matières sèches</b> 2,12 %		<b>Métaux lourds</b> (mg/kg m.s.)	
<b>Alcalinité</b> pH : 6,1		Arsenic (As):	1,90
<b>Matières fertilisantes</b> (mg/kg m.s.)		Bore (B):	47,5
Azote (N) total:	65000	Cadmium (Cd):	4,00
Azote ammoniacal:	3100	Cobalt (Co):	10,0
Nitrites + Nitrates:	50	Chrome (Cr):	37,0
Phosphore (P) total:	16700	Cuivre (Cu):	720
Phosphore (P) inorg.:	10400	Fer (Fe):	7200
Potassium (K):	9437	Magnésium (Mg):	4500
Calcium (Ca):	8000	Manganèse (Mn):	940
Sodium (Na):	n.d.	Mercur (Hg):	1,60
<b>Composés organiques</b> (mg/Kg m.s.)		Molybdène (Mo):	21,0
BPC:	0,1	Nickel (Ni):	36,0
		Plomb (Pb):	58,0
		Sélénium (Se):	2,90
		Zinc (Zn):	332

Analyses effectuées par le laboratoire Génie sanitaire de l'Université de Sherbrooke (Québec, Canada).

**Tableau A-VI. Bulletin d'analyse des boues résiduaires de la municipalité de Lac  
Mégantic utilisées pour les amendements en laboratoire en 1995.**

<b>Paramètres des boues analysés (sur la base de la matière sèche)</b>			
<b>Matières sèches</b> 14,5 %		<b>Métaux lourds</b> (mg/kg m.s.)	
<b>Alcalinité</b>		Aluminium (Al):	21000
pH : 6,55		Arsenic (As):	6,70
<b>Matières fertilisantes</b> (mg/kg m.s.)		Bore (B):	17,0
Azote (N) total:	59500	Cadmium (Cd):	< 1,00
Azote ammoniacal:	3900	Cobalt (Co)	< 5,0
Nitrites + Nitrates:	22	Chrome (Cr):	54,0
Phosphore (P) total:	24000	Cuivre (Cu):	905
Phosphore (P) inorg.:	n.d.	Fer (Fe):	18000
Potassium (K):	3200	Magnésium (Mg):	3750
Calcium (Ca):	11000	Manganèse (Mn):	1500
Sodium (Na):	n.d.	Mercure (Hg):	4,90
<b>Composés organiques</b> (mg/Kg m.s.)		Molybdène (Mo):	3,9
BPC:	< 1,0	Nickel (Ni):	22,0
		Plomb (Pb):	44,0
		Sélénium (Se):	0,42
		Zinc (Zn):	370

Analyses effectuées par le laboratoire Créalab Inc. de Sherbrooke (Québec, Canada).

**Tableau A-VII. Bulletin d'analyse des boues résiduelles de la municipalité de Princeville  
utilisées pour la fertilisation des sites amendés en 1993.**

<b>Paramètres des boues analysés (sur la base de la matière sèche)</b>			
<b>Matières sèches</b> 2,24 %		<b>Métaux lourds</b> (mg/kg m.s.)	
<b>Alcalinité</b> pH : 6,8		Aluminium (Al):	120000
<b>Matières fertilisantes</b> (mg/kg m.s.)  Azote (N) total: 32500 Azote ammoniacal: 5800 Nitrites + Nitrates: < 10 Phosphore (P) total: 16300 Phosphore (P) inorg.: 6800 Potassium (K): 3200 Calcium (Ca): 37000 Sodium (Na): n.d.		Arsenic (As):	3,50
		Bore (B):	9,8
		Cadmium (Cd):	< 1,00
		Cobalt (Co):	3,3
		Chrome (Cr):	200
		Cuivre (Cu):	580
		Magnésium (Mg):	2700
		Manganèse (Mn):	430
		Mercure (Hg):	< 0,02
<b>Composés organiques</b> (mg/Kg m.s.)  BPC: < 2,0		Molybdène (Mo):	< 2,0
		Nickel (Ni):	< 10,0
		Plomb (Pb):	< 20,0
		Sélénium (Se):	< 2,50
		Zinc (Zn):	430

Analyses effectuées par les Groupes Proserco Inc. et Novalab Ltée. de Montréal (Québec, Canada).

**Tableau A-VIII. Bulletin d'analyse des boues résiduelles de la municipalité de Princeville utilisées pour la fertilisation du site amendé en 1994.**

<b>Paramètres des boues analysés (sur la base de la matière sèche)</b>			
<b>Matières sèches</b> 2,26%		<b>Métaux lourds</b> (mg/kg m.s.)	
<b>Alcalinité</b> pH : 7,1		Aluminium (Al):	110000
<b>Matières fertilisantes</b> (mg/kg m.s.)		Arsenic (As):	1,3
Azote (N) total:	24800	Bore (B):	190
Azote ammoniacal:	2300	Cadmium (Cd):	< 1,00
Nitrites + Nitrates:	< 10	Cobalt (Co):	< 20,0
Phosphore (P) total:	105300	Chrome (Cr):	180
Phosphore (P) inorg.:	35950	Cuivre (Cu):	450
Potassium (K):	2900	Magnésium (Mg):	2600
Calcium (Ca):	31000	Manganèse (Mn):	450
Sodium (Na):	n.d.	Mercure (Hg):	0,36
<b>Composés organiques</b> (mg/Kg m.s.)		Molybdène (Mo):	< 20,0
BPC:	< 0,4	Nickel (Ni):	< 10,0
		Plomb (Pb):	< 20,0
		Sélénium (Se):	1,3
		Zinc (Zn):	460

Analyses effectuées par les Groupes Proserco Inc. et Novalab Ltée. de Montréal (Québec, Canada).



## **ANNEXE B**

### **BULLETINS D'ANALYSE DE LA TENEUR DES SOLS EN CERTAINS MÉTAUX LOURDS DISPONIBLES**

Tableau B-I. Teneurs moyennes en métaux lourds disponibles dans le sol pour les sites de la région de la municipalité de Lac Mégantic.

Tableau B-II. Teneurs moyennes en métaux lourds disponibles dans le sol pour les sites de la région de la municipalité de Princeville.

**Tableau B-I. Teneurs moyennes en métaux lourds disponibles dans le sol pour les sites de la région de la municipalité de Lac Mégantic.**

Métal dosé	Site valorisé (année(s))	Parcelle fertilisée		Parcelle témoin	
		Moyenne (mg/kg)	Écart-type (mg/kg)	Moyenne (mg/kg)	Écart-type (mg/kg)
<b>Cadmium</b> (Cd*)	1989	0,00	0,00	0,04	0,05
	1990+91	0,07	0,05	0,11	0,04
	1992	0,02	0,03	0,05	0,04
<b>Cuivre</b> (Cu*)	1989	0,10	0,05	0,06	0,07
	1990+91	0,00	0,00	0,13	0,09
	1992	0,17	0,09	0,12	0,07
<b>Plomb</b> (Pb)	1989	0,00	0,00	0,00	0,00
	1990+91	0,58	0,12	0,33	0,14
	1992	0,60	0,29	0,36	0,14
<b>Zinc</b> (Zn*)	1989	0,35	0,34	0,52	0,11
	1990+91	0,19	0,15	0,59	0,26
	1992	0,19	0,09	0,15	0,07

Analyses effectuées par le laboratoire du D<sup>r</sup> Claude Camiré au centre de recherche en biologie forestière, Faculté de foresterie et de géodésie, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada.  
Source: Lefebvre, 1996.

\* Ces trois métaux lourds faisaient partie de l'étude de vérification de l'augmentation possible des populations bactériennes résistantes aux métaux lourds dans les sols ayant été fertilisés avec des boues résiduelles.

**Tableau B-II. Teneurs moyennes en métaux lourds disponibles dans le sol pour les sites de la région de la municipalité de Princeville.**

<b>Métal dosé</b>	<b>Site valorisé (année(s))</b>	<b>Parcelle fertilisée</b>		<b>Parcelle témoin</b>	
		Moyenne (mg/kg)	Écart-type (mg/kg)	Moyenne (mg/kg)	Écart-type (mg/kg)
<b>Cadmium</b>	1993	0,15	0,08	0,11	0,09
(Cd*)	1993+94	0,04	0,05	0,02	0,03
<b>Cuivre</b>	1993	0,04	0,07	0,00	0,00
(Cu*)	1993+94	0,10	0,06	0,06	0,05
<b>Plomb</b>	1993	0,52	0,52	0,46	0,45
(Pb)	1993+94	0,04	0,06	0,04	0,09
<b>Zinc</b>	1993	0,80	0,94	1,88	0,93
(Zn*)	1993+94	0,40	0,08	0,44	0,03

Analyses effectuées par le laboratoire du D<sup>r</sup> Claude Camiré au centre de recherche en biologie forestière, Faculté de foresterie et de géodésie, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada.  
Source: Lefebvre, 1996.

\* Ces trois métaux lourds faisaient partie de l'étude de vérification de l'augmentation possible des populations bactériennes résistantes aux métaux lourds dans les sols ayant été fertilisés avec des boues résiduaires.

## RÉFÉRENCES

- ABBASZADEGAN, M., M.S. HUBER, C.P. GERBA et I.L. PEPPER. 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 1318-1324.
- ALEXANDER, M. 1977. Introduction to soil microbiology. 2<sup>e</sup> édition. Éditeurs : J. Wiley et fils, New York, 472 p.
- ALLAWAY, W.H. 1968. Agronomic controls over the environmental cycling of trace elements. *Advances in Agronomy* 20 : 235-274.
- ANDERSON, D.A. 1983. Reproductive success of columbian black-tailed deer in a sewage-fertilized forest in western Washington. *J. Wildl. Manage* 47 : 243-247.
- ANDERSON, J.P.E. et K.H. DOMSCH. 1973. Quantification of bacterial and fungal contributions to soil respiration. *Archiv. Fur. Mikrobiologie (Berlin)* 93 : 113-127.
- ANDERSON, J.P.E. et K.H. DOMSCH. 1975. Measurement of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural and forest soils. *Can. J. Microbiol.* 21 : 314-322.
- ANDERSON, J.P.E. et K.H. DOMSCH. 1978a. Mineralization of bacteria and fungi in chloroform-fumigated soils. *Soil Biol. Biochem.* 10 : 207-213.
- ANDERSON, J.P.E. et K.H. DOMSCH. 1978b. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biol. Biochem.* 10 : 215-221.
- ANTONOVICS, J., A.D. BRADSHAW et R.G. TURNER. 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Adv. Ecol. Res.* 7 : 1-85.
- ARCHULETA, J.G. et G.D. EASTON. 1981. The cause of deep-pitted scab of potatoes. *Am. Potato J.* 58 : 385-392.
- ASCHMANN, S.G., M.S. McINTOSH, J.S. ANGLE et R.L. HILL. 1992. Nitrogen movement under a hardwood forest amended with liquid wastewater sludge. *Agri. Ecosys. Environ.* 38 : 249-263.
- ATLAS, R.M. 1986. Applicability of general ecological principles to microbial ecology. Pp. 339-370 dans *Bacteria in nature vol.2 : Methods and special applications in bacterial ecology*. Éditeurs : J.S. Poindexter et E.R. Leadbetter. Plenum Press, New York, 385 p.

ATLAS, R.M. et R. BARTHA. 1993. Microbial ecology : Fundamentals and applications. 3<sup>e</sup> édition. The Benjamin/Cummings publishing company, Redwood City, CA, 563 p.

ATLAS, R.M. et A.K. BEJ. 1990. Detecting bacterial pathogens in environmental water samples by using the PCR and gene probes. Pp. 399-407 dans PCR protocols : A guide to methods and applications. Éditeurs : M.A. Innis, D.G. Gelfand, J.J. Sninsky et T.J. White. Academic Press, New York, 482 p.

AUSTIN, B., D.A. ALLEN, A.L. MILLS et R.R. COLWELL. 1977. Numerical taxonomy of heavy metal-tolerant bacteria isolated from an estuary. Can. J. Microbiol. 23 : 1433-1447.

BABICH, H. et G. STOTZKY. 1980. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. Crit. Rev. Microbiol. 8 : 99-145.

BALKWILL, D.L., D.P. LABEDA et L.E. CASIDA, Jr. 1975. Simplified procedure for releasing and concentrating microorganisms from soil for transmission electron microscopy viewing as thin-section and frozen-etched preparations. Can. J. Microbiol. 21 : 252-262.

BAKER, D.E., M.C. AMACHER et R.M. LEACH. 1979. Sewage sludge as a source of cadmium in soil-plant-animal systems. Environ. Health Perspect. 28 : 45-49.

BAKKEN, L.R. 1985. Separation and purification of bacteria from soil. Appl. Environ. Microbiol. 49 : 1482-1487.

BASTIAN, R.K. 1986. Overview on sludge utilization. Pp. 7-25 dans The forest alternative for traitement and utilization of municipal and industrial wastes. Éditeurs : W.D. Cole, C.L. Henry et W.L. Nutter, University of Washington Press, Seattle.

BEAUCHEMIN, S., M.R. LAVERDIÈRE et C. SCRAIRE. 1993. Revue de la littérature sur les métaux, l'azote et le phosphore dans les boues d'origine municipale, des pâtes et papiers et de désencrage en prévision de leur valorisation en milieu agricole et forestier. Cogisol Inc. pour le ministère des forêts du Québec, Québec, 112 p.

BECKER-ANDRÉ, M. et K. HALBROCK. 1989. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). Novel approach by a PCR-aided transcript titration assay (PATTY). Nucl. Acids Res. 17 : 9437-9446.

BEJ, A.K., J.L. DICESARE, L. HAFF et R.M. ATLAS. 1991a. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uid*. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 1013-1017.

- BEJ, A.K., M.H. MAHBUBANI et R.M. ATLAS. 1991b. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water using PCR and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 597-600.
- BEJ, A.K., M.H. MAHBUBANI et R.M. ATLAS. 1991c. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26 : 301-334.
- BEJ, A.K., S.C. McCARTY et R.M. ATLAS. 1991d. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction : comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 2429-2432.
- BEJ, A.K., R.J. STEFFAN, J. DICESARE, L. HAFF et R.M. ATLAS. 1990. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 307-314.
- BELASCO, J.G. et C.F. HIGGINS. 1988. Mechanisms of mRNA decay in bacteria : a perspective. *Gene* 72 : 15-23.
- BENTLEY, R.W., J.A. LEIGH et M.D. COLLINS. 1993. Development and use of species-specific oligonucleotide probes for differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 : 57-60.
- BEWLEY, R.J.F. et R. CAMPBELL. 1980. Influence of zinc, lead, and cadmium pollutants on the microflora of Hawthorn leaves. *Microb. Ecol.* 6 : 227-240.
- BINGHAM, F.T. 1979. Bioavailability of Cd to food crops in relation to heavy metal content of sludge-amended soil. *Environ. Health Perspect.* 28 : 39-43.
- BOLE, J.B. et R.G. BELL. 1978. Land application of municipal sewage wastewater : yield and chemical composition of forage crops. *J. Environ. Qual.* 7 : 222-226.
- BOLLET, C., M.J. GEVAUDAN, X. de LAMBALLERIE, C. ZANDOTTI et P. de MICCO. 1991. A simple method for the isolation of chromosomal DNA from gram positive or acid-fast bacteria. *Nucl. Acids Res.* 19 : 1955-1963.
- BOLTON, H., J.K. FREDERICKSON et L.F. ELLIOTT. 1993. Microbial ecology of the rhizosphere. Pp. 27-64 dans *Soil microbial ecology*. Éditeur : F.B. Metting. M. Dekker Inc., New York, 646 p.
- BOUWER, H., J.C. LANCE et M.S. RIGGS. 1974. High-rate land treatment. II : Water

quality and economic aspects of the Flushing Meadows project. J. Wat. Poll. Control Fed. 45 : 844-59.

BOWEN, P.T., M.K. JACKSON et R.A. CORBITT. 1991. Sludge treatment, usage, and disposal. Research Journal of Water Pollution Control Federation 63 : 406-410.

BRADY, N.C. 1984. The nature and properties of soils, 9<sup>e</sup> édition. Macmillan, New York.

BRAUNS, L.A., M.C. HUDSON et J.D. OLIVER. 1991. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 265-2655.

BRAY, B.J., R.H. DOWDY, R.D. GOODRICH et D.E. PAMP. 1985. Trace metal accumulation in tissues of goats fed silage produced on sewage sludge-amended soil. J. Environ. Qual. 14 : 114-118.

BROCKWAY, D.G. 1988. Sludge fertilization of state forest land in northern Michigan. EPA, Michigan department of natural resources et Michigan State University, 92 p.

BRUCE, K.D., W.D. HIRNS, J.L. HOBMAN, A.M. OSBORN, P. STRIKE et D.A. RITCHIE. 1992. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 3413-3416.

BUCK, J.D. 1979. The plate count in aquatic microbiology. Pp. 19-28 dans Native aquatic bacteria : Enumeration, activity and ecology. Éditeurs : J.W. Costerton et R.R. Colwell. ASTM special technical publication no. 695. American Society for Testing Materials. Philadelphie.

BURGE, W.D. et P.B. MARSH. 1978. Infectious disease hazards of landspreading sewage wastes. J. Environ. Qual. 7 : 1-9.

BURLAGE, R.S., G.S. SAYLER et F.W. LARIMER. 1990. Monitoring of naphthalene catabolism by bioluminescence with *nah-lux* transcriptional fusions. J. Bacteriol. 172 : 4749-4757.

BYRD, J.J. et R.R. COLWELL. 1992. Microscopy applications for analysis of environmental samples. Pp. 93-112 dans Microbial ecology : Principles, methods, and applications. Éditeurs : M.A. Levin, R.J. Seidler et M. Rogul. McGraw-Hill, New York.

CAMPBELL, R. 1983. Microbial ecology. 2<sup>e</sup> édition. Blackwell Scientific Publications, Alden Press Ltd, Oxford, 191 p.

CANCILLA, M.R., I.B. POWELL, A.J. HILLIER et B.E. DAVIDSON. 1992. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with  $p^{32}$  and fluorescent labels. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 1772-1775.

CHANEY, R.L. 1980. Health risks associated with toxic metals in municipal sludge. Pp. 59-83 dans Sludge - Health risks of land application. Éditeurs : G. Bitton, B.L. Damron, G.T. Edel et J.M. Davidson. Ann Arbor Science Publishers. Ann Arbor.

CHANEY, R.L., G.S. STOEWSAND, A.K. FURR, C.A. BACHE et D.J. LISK. 1978. Cadmium deposition and hepatic microsomal induction in mice fed lettuce grown on municipal sludge-amended soil. J. Agric. Food Chem. 26 : 992-994.

CHANG, A.C., J.E. WARNEKE, A.L. PAGE et L.J. LUND. 1984. Accumulation of heavy metals in sewage sludge-treated soils. J. Environ. Qual. 13 : 87-94.

CHAUDRI, A.M., S.P. McGRATH, K.E. GILLER, E. RIETZ et D. SAUERBECK. 1993. Enumeration on indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soils previously treated with metal-contaminated sewage sludge. Soil Biol. Biochem. 25 : 301-309.

CHORNET, E., L. RACINE, C. ANSSEAU, P. DE WALS, C. BEAULIEU, J.-M. BERGERON, M. BILODEAU, F. BONN, S.DANEALT, J.-M. DUBOIS, P. HANEL, M. HEITZ, J.-P. KESTEMAN, F. LAROSE, G. LEGAULT, Y. LENOIR, B. MARCOS, A. MARQUIS, A. PAYETTE, J.W. SHIPLEY et P. VIDAL. 1992. STOPER, SStratégies d'Optimisation d'Écosystèmes Régionaux. Proposition de projet de recherche soumise au secrétariat Inter-conseils, formé du Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie, du Conseil de recherche médicale et du Conseil en sciences humaines. STOPER, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

CLOUTIER, C. 1995. Analyse écologique et économique des impacts de la valorisation des boues d'épuration sur une communauté forestière. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, 113 p.

COCHRAN, W.G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the most probable number. Biometrics 2 : 105-116.

COLWELL, R.R. 1979. Enumeration of specific populations by the most-probable-number (MPN) method. Pp. 56-64 dans Native aquatic bacteria : Enumeration, activity and ecology. Éditeurs : J.W. Costerton et R.R. Colwell. ASTM special technical publication no. 695. American Society for Testing Materials. Philadelphie.

COUILLARD, D. 1988. Étude de quelques indices de croissance du *Larix laricina* fertilisé par



des boues anaérobies. *Environmental Technology Letters* 9 : 191-206.

COUILLARD, D. 1989. Élimination des boues urbaines par la fertilisation sylvicole. *Can. J. Civ. Eng.* 16 : 650-660.

COUILLARD, D., P. CHOUINARD et G. MERCIER. 1993. Risques environnementaux associés à la présence de contaminants organiques de synthèse dans différentes boues résiduelles lors de leur valorisations en milieux agricoles et forestiers - Revue de la littérature, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, INRS-Eau, pour le ministère des forêts du Québec, Ste-Foy, 108 p.

COUILLARD, D. et G. GRENIER. 1990. Évaluation des risques environnementaux concernant la présence de composés synthétiques organiques toxiques dans les boues résiduelles municipales lors de leur valorisation (revue de la littérature). *Water Poll. Res. J. Canada* 25 : 109-130.

COUILLARD, D. et G. MERCIER. 1990. Bacterial leaching of heavy metals from sewage sludge-bioreactors comparison. *Environ. Poll.* 66 : 237-252.

COUILLARD, D. et G. MERCIER. 1991. Optimum residence time (in CSTR and airlift reactor) for bacterial leaching of metal from anaerobic sewage sludge. *Wat. Res.* 25 : 211-218.

CRAUN, G.F. 1984. Health aspects of groundwater pollution. Pp. 135-180 dans *Groundwater pollution microbiology*. Éditeurs : G. Bitton et C.P. Gerba. John Wiley and Sons, New York.

CROHN, D.M. 1995. Sustainability of sewage sludge application to northern hardwood forest. *Ecol. Appl.* 5 : 53-62.

DALEY, R.J. et J.E. HOBBIE. 1975. Direct count of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique. *Limnol. Oceano.* 20 : 875-882.

DeBRUIJN, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and others soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 2180-2187.

DEGRANGE, V. et R. BARDIN. 1995. Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 2093-2098.

DELEON, R., C. SHIEH, R.S. BARIC et M.D. SOBSEY. 1991. Detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples by gene probes and polymerase chain reaction.

Proc. Wat. Qual. Tech. Conf., San Diego, Calif. (1990). Pp. 833-853.

DEMING, J.W., G.L. PICCIOLO et E.W. CHAPPELLE. 1979. Important factors in adenosine triphosphate determination using firefly luciferase : Applicability of the assay to studies of native aquatic bacteria. Pp. 89-98 dans Native aquatic bacteria : Enumeration, activity and ecology. Éditeurs : J.W. Costerton et R.R. Colwell. ASTM Special Technical Publication no. 695. American Society for Testing Materials, Philadelphie.

DIAZ, L.F., G.M. SAVAGE, L.L. EGGERTH et C.G. GOLUEKE. 1993. Composting and recycling municipal solid waste. Lewis Publishers, Boca Raton, 296 p.

DIAZ-BURGOS, M.A., B. CECCANTI et A. POLO. 1993. Monitoring biochemical activity during sewage sludge composting. Biol. Fertil. Soils 16 : 145-150.

DIAZ-RAVINA, M. et E. BAATH. 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 2970-2977.

DIAZ-RAVINA, M., E. BAATH et A. FROSTEGARD. 1994. Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 2238-2247.

DIJKMANS, R., A. JAGERS, S. KREPS, J.-M. COLLARD et M. MERGEAY. 1993. Rapid method for purification of soil DNA for hybridization and PCR analysis. Microb. Releases 2 : 29-34.

DOERING-SAAD, C., P. KAMPFER, S. MANULIS, G. KRITZMAN, J. SCHNEIDER, J. ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, H. SCHREMPFAND et I. BARASH. 1992. Diversity among *Streptomyces* strains causing potato scab. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 3932-3940.

DOMSCH, K.H., W. GAMS et T.H. ANDERSON. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press, New York.

DOWDY, R.H., B.J. BRAY et R.D. GOODRICH. 1983. Trace metal and mineral composition of milk and blood from goats fed silage produced on sludge-amended soil. J. Environ. Qual. 12 : 473-477.

DRAHOS, D.J., B.C. HEMMING et S. McPHERSON. 1986. Tracking recombinant organisms in the environment :  $\beta$ -galactosidase as a selectable non-antibiotic marker for fluorescent *Pseudomonads*. Bio/Techniques 4 : 439-444.

DUFF, J.-N., P. ARNOUX, G. ASSELIN, S. BEAUREGARD, C. CAMIRÉ, C. CHARETTE, C. CLOUTIER, A. LABELLE, L. LAPERRIÈRE, M. MESSIER, R. POTVIN, M. ROBITAILLE, A. SAULNIER et L. VASSEUR. 1995. Analyses des impacts environnementaux de la valorisation sylvicole des boues d'épuration et mise au point d'un équipement d'épandage. Groupe HBA experts-conseils S.E.N.C., pour le Ministère de l'Environnement et de la faune du Québec, 405 p.

DUXBURY, T. 1986. Microbes and heavy metals : an ecological overview. *Microbiol. Sci.* 3 : 330-333.

EDGEHILL, R.U. et R.K. FINN. 1983. Microbial Treatment of soil to remove pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 : 1122-1125.

EDWARDS, U., T. ROGALL, H. BOCKER, M. EMDE et E. BOTTGER. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* 17 : 7843-7853.

FAEGRI, A., V.L. TORSVIK et J. GOKSOYR. 1977. Bacterial and fungal activities in soil : separation of bacteria by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biol. Biochem.* 9 : 105-112.

FAUCHER, E., E. PARADIS, C. GOYER, N.C. HODGE, R. HOGUE, R.E. STALL et C. BEAULIEU. 1995. Characterization of Streptomycetes causing deep-pitted scab of potato in Québec, Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 : 222-225.

FAUCHER, E., T. SAVARD et C. BEAULIEU. 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Can. J. Plant Pathol.* 14 : 197-202.

FEKETE, A., J.A. BANTLE, S.M. HALLING et R.W. STICH. 1992. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.* 174 : 7778-7783.

FERGUSON, R.L., E.N. BUCKLEY et A.V. PALUMBO. 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 : 49-55.

FLANAGAN, P.W. 1978. Microbial decomposition in Arctic tundra and subarctic taiga ecosystems. Pp. 161-169 dans *Microbial ecology*. Éditeurs : M.W. Loutit et J.A.R. Miles. Springer-Verlag, New York, 452 p.

FREDERICK, L.R. 1965. Microbial populations by direct microscopy. Pp. 1452-1459 dans

Methods in soil analysis part 2 : Chemical and Microbiological properties. Éditeurs : R.G. Burns et J.H. Slater. American Society of Agronomy et American Society for Testing and Materials. Madison, Wis., 1572 p.

FREDERICKSON, J.K., D.F. BEZDICEK, F.E. BROCKMAN et S.W.LI. 1988. Enumeration of *Tn5* mutant bacteria in soil by using a most-probable-number-DNA hybridization and antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 446-453.

FUHRMAN, J.A., D.E. COMEAU, A. HAGSTROM et A.M. CHAM. 1988. Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 1426-1429.

GADD, G.M. 1990. Metal tolerance. Pp. 178-210 dans *Microbiology of extreme environments*. Éditeur : C. Edwards. McGraw-Hill Publishing company, New York, 218p.

GARCIA-MIRAGAYE, J. et A.L. PAGE. 1976. Influence of ionic strength and inorganic complex formation on the sorption of trace amounts of Cd to montmorillonite. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 40 : 658-662.

GAUS, J., S. BRALLIER, R.B. HARRISON, S. COVENY et J. DEMPSEY. 1990. Literature review on pathogen survival and transport in sludge amended soil - Draft copy. College of Forest Ressources, University of Washington, Seattle, 40 p.

GELFAND, D.H. et T.J. WHITE. 1990. Thermostable DNA polymerases. Pp. 129 et suivantes dans *PCR protocols : A guide to methods and applications*. Éditeurs : M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky et T.J. White. Academic Press, San Diego.

GILLER, K.E., R. NUSSBAUM, A.M. CHAUDRI et S.P. McGRATH. 1993. *Rhizobium meliloti* is less sensitive to heavy-metal contamination in soil than *R. leguminosarum* Bv. *trifolii* or *R. loti*. *Soil Biol. Biochem.* 25 : 273-278.

GILLILAND, G., S. PERRIN, K. BLANCHARD et H.F. BUNN. 1990a. Analysis of cytokine mRNA and DNA : detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87 : 2725-2729.

GILLILAND, G., S. PERRIN et H.F. BUNN. 1990b. Competitive PCR for quantitation of mRNA. Pp. 60-69 dans *PCR protocols : A guide to methods and applications*. Éditeurs : M. Innis, D. Gelfand, D. Sninsky et T. White. New York : Academic, New York, 482 p.

GILMAN, J.C. 1945. A manual of soil fungi. The Iowa State College Press, Ames, Iowa, 392 p.

GINGELL, S.M., R. CAMPBELL et M.H. MARTIN. 1976. The effect of zinc, lead and cadmium pollution on the leaf surface microflora. *Environ. Pollut.* 11 : 25-37.

GOEBEL, U.B., A. GEISER et E.J. STANBRIDGE. 1987. Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between *Mycoplasma* species. *J. Gen. Microbiol.* 133 : 1969-1974.

GOVERNEMENT DU CANADA. 1991. L'état de l'environnement au Canada aujourd'hui, Ministère des Approvisionnements et des Services du Canada, Ottawa.

GOYER, C., E. FAUCHER et C. BEAULIEU. 1996. *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Québec, Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 : 635-639.

GRANT, F.A., L.A. GLOVER, K. KILLHAM et J.I. PROSSER. 1991. Luminescence-based viable cell enumeration of *Erwinia carotovora* in the soil. *Soil Biol. Biochem.* 23 : 1021-1024.

GRAY, T.R.G. 1967. Stereoscan electron microscopy of soil microorganisms. *Science* 155 : 1668-1670.

GRAY, T.R.G., P. BAXBY, I.R. HALL et M. GOODFELLOW. 1968. Direct observation of bacteria in soil. Pp. 171-197 dans *The ecology of soil bacteria*, Éditeurs : T.R.G. Gray et D. Parkinson. University of Toronto Press, Toronto, Canada, 681 p.

GRAY, T.R.G. et D. PARKINSON. 1968. *The ecology of soil bacteria*. University of Toronto Press, Toronto, Canada, 681 p.

GRENIER, Y. 1989. La valorisation des boues d'usine d'épuration des eaux pour la fertilisation des forêts, Mémoire no. 98, Gouvernement du Québec, Ministère de l'Énergie et des Ressources (Forêts), Direction de la Recherche et du Développement, 190 p.

GRUNSTEIN, M. et D.S. HOGNESS. 1975. Colony hybridization : A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 72 : 3961-3965.

HAHNE, H.C.H. et W. KRONNTEJE. 1973. Significance of pH and chloride concentration on behavior of heavy metal pollutants : mercury (II), cadmium (II), zinc (II), and lead (II). *J. Environ. Qual.* 2 : 444-450.

HALLAS, L.E., J.S. THAYER et J.J. COONEY. 1982. Factors affecting the toxic effect of tin on estuarine microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 : 193-197.

HAMILTON, D.L., R.P. BROCKMAN et J.E. KNIPFEL. 1984. The agriculture use of

municipal sewage. Can. J. Physiol. Pharmacol. 62 : 1049-1055.

HANAHAN, D. et M. MESELSON. 1980. Plasmid screening at high colony density. Gene 10 : 63-67.

HARRIS, J.E., T.R. McKEE, R.C. WILSON et U.G. WHITEHOUSE. 1972. Preparation of membrane filter samples for direct examination with an electron microscope. Limnology and Oceanography 17 : 784-787.

HARTER, R.D. 1983. Effect of soil pH on adsorption of lead, copper, zinc, and nickel. Soil Sci. Soc. Am. J. 47 : 47-51.

HATTORI, T. et R. HATTORI. 1976. Microbial life in the soil : an introduction. Éditeur : M. Dekker, New York.

HAYS, B.D. 1977. Potential for parasitic disease transmission with land application of sewage plant effluents and sludges. J. Wat. Res. 11 : 583-595.

HEALY, F.G. et D.H. LAMBERT. 1991. Relationship among *Streptomyces* spp. causing potato scab. Int. J. Syst. Bacteriol. 41 : 479-482.

HERGSTROM, L.J. et S.D. WEST. 1989. Heavy metal accumulation in small mammals following sewage sludge application to forest. J. Environ. Qual. 18 : 345-349.

HIGUCHI, R. 1992. Simple and rapid preparation of samples for PCR. Pp. 31-38 dans PCR technology. Éditeur : H.A. Erlich. W.H. Freeman and Co., New York.

HOBBIE, J.E. et C.C. CRAWFORD. 1969. Respiration corrections for bacterial uptake of dissolved organic compounds in natural waters. Limnology and Oceanography 14 : 528-532.

HOLBEN, W.E., J.K. JANSSON, B.K. CHELM et J.M. TIEDJE. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. Appl. Environ. Microbiol. 54 : 703-711.

HOLM-HANSON, O. 1969. Determination of microbial biomass in ocean profiles. Limnology and Oceanography 19 : 31-34.

HOODA, P.S. et B.J. ALLOWAY. 1993. Effects of time and temperature on the bioavailability of Cd and Pb from sludge-amended soils. J. Soil Sci. 44 : 97-110.

HOPPE, H.G. 1978. Relations between active bacteria and heterotrophic potential in the sea.

Neth. J. Sea Res. 12 : 78-98.

HOPWOOD, D.A., M.J. BIBB, K.F. CHATER, T. KIESER, C.J. BRUTON, H.M. KIESER, D.J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WARD et H. SCHREMPF. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces* : A laboratory manual. The John Innes Foundation. John Innes Institute, F. Crowe & sons Ltd., Norwich, Angleterre, 356 p.

IBIEBELE, D.D., A.D. INYANG, C.H. LAWRENCE, R.L. COLEMAN et N. PEES. 1985. Some characteristics of the behaviour of indicator bacteria in sewage-amended soil. Environ. Pollut. Ser. A. 39 : 175-182.

IBIEBELE, D.D. et A.D. INYANG. 1986. Environmental movement of indicator bacteria from soil amended with undigested sewage sludge. Environ. Pollut. Ser. A. 40 : 53-62.

INGRAM, C.M., P. BRAUNER, P. YOUNGMAN et J. WESTPHELING. 1989. *xylE* functions as an efficient reporter gene in *Streptomyces* spp. : Use for the study of *galP1*, a catabolite-controlled promoter. J. Bacteriol. 171 : 6617-6624.

IMPRAIM, C.C., R.K. SAIKI, H.A. ERLICH et R.L. TEPLITZ. 1987. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffinembedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. Biochem. Biosphys. Res. Commun. 142 : 710-716.

ITOYAMA, T.A., H. YOKOSE, S. YOSHIDA et M. KUWAHARA. 1990. Evaluation of land application using secondary effluent in a forest slope : estimation of drained water quality and discussion of the effects upon soil or plants and behaviour of bacteria. Wat. Res. 24 : 275-288.

JACOBSEN, C.S. et O.F. RASMUSSEN. 1992. Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 2458-2462

JANSSON, J.K., W.E. HOLBEN et J.M. TIEDJE. 1989. Detection in soil of a deletion in an engineered DNA sequence by using gene probes. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 3022-3025.

JEFFERSON, R.A., S.M. BURGESS et D. HIRSH. 1986.  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83 : 8447-8451.

JENKINSON, D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. Part IV, The decomposition of fumigated organisms in soil. Soil Biol. Biochem. 8 : 203-208.

JENKINSON, D.S. et D.S. POWLSON. 1976. The effects of biocidal treatments on

metabolism in soil. Part V, A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* 8 : 209-213.

JENSEN, M.A., J.A. WEBSTER et N. STRAUS. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 945-952.

JING, J. et T.J. LOGAN. 1992. Effects of sewage sludge cadmium concentration on chemical extractability and plant uptake. *J. Environ. Qual.* 21 : 73-81.

JONES, P.C.T. et J.E. MOLLISON. 1948. The technique for the quantitative estimation of soil microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 2 : 54-69.

JOSEPHSON, K.L., C.P. GERBA et I.L. PEPPER. 1993. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 3513-3515.

JOSEPHSON, K.L., S.D. PILLAI, J. WAY, C.P. GERBA et I.L. PEPPER. 1991. Detection of fecal coliforms in soil by polymerase chain reaction and DNA : DNA hybridizations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55 : 1326-1332.

JUDD, A.K., M. SCHNEIDER, M.J. SADOWSKY et F.J. DeBRUIJN. 1993. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 1702-1708.

KERKHOF, L. 1994. A species-specific probe and a PCR assay for the marine bacterium, *Pseudomonas stutzeri* strain *Zobell*. *Microb. Ecol.* 27 : 201-212.

KHAN, A.A. et C.E. CERNIGLIA. 1994. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 3739-3745.

KHANNA, M. et G. STOTZKY. 1990. Transformation by DNA bound on clay minerals : implications for gene transfer in soil and other habitats. Abstr. Q-191, p. 320 dans Abstr. 90th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1990. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

KING, J.D. et D.C. WHITE. 1977. Muramic acid as a measure of microbial biomass in estuarine and marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 : 777-783.

KINSLEY, M.T. et B.B. BOHLOOL. 1981. Release of *Rhizobium* spp. from tropical soils and recovery for immunofluorescence enumeration. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 : 241-248.



- KNIGHT, I.T., W.E. HOLBEN, J.M. TIEDJE et R.R. COLWELL. 1992. Nucleic acid hybridization techniques for detection, identification, and enumeration of microorganisms in the environment. Pp. 65-91 Microbial ecology : Principles, methods, and applications. Éditeurs : M.A. Levin, R.J. Seidler et M. Rogul. McGraw-Hill, New York.
- KUO, S. et A.S. BAKER. 1980. Sorption of copper, zinc, and cadmium by some acid soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 44 : 969-974.
- KWOK, S. et R. HIGUCHI. 1989. Avoiding false positive with PCR. Nature 339 : 237-238.
- LAMBERT, D.H. et R. LORIA. 1989a. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39 : 393-396.
- LAMBERT, D.H. et R. LORIA. 1989b. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 39 : 387-392.
- LAWRENCE, C.H. 1964. Gale commune de la pomme de terre. Agriculture Canada publication no. 953. Agriculture Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
- LEE, S.-Y., J. BOLLINGER, D. BEZDICEK et A. OGRAM. 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 3787-3793.
- LEFEBVRE, A. 1996. La valorisation agricole des boues d'usine d'épuration d'eaux usées municipales : Impact sur la chaîne alimentaire humaine. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, 123 p.
- LESTER, J.N., R.M. STERRITT et P.W.W. KIRK. 1983. Significance and behaviour of heavy metals in waste water treatment processes II : Sludge treatment and disposal. The Science of the Total Environment 30 : 45-83.
- LIESACK, W., N. WARD et E. STACKEBRANDT. 1991. Strategies for molecular microbial ecological studies. Actinomycetes 2 : 63-76.
- LIESACK, W., H. WEYLAND et E. STACKEBRANDT. 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. Microb. Ecol. 21 : 191-198.
- LIGHTHART, B. 1980. Effect of certain cadmium species on pure and litter populations of microorganisms. Antonie van Leeuwenhoek 46 : 161-167.

LOGAN, T.L. et R.L. CHANEY. 1983. Utilization of municipal wastewater and sludge on land - Metals. Pp. 235-326 dans Proceedings of the 1983 workshop on utilization of municipal wastewater and sludge on land. Éditeurs : A.L. Page, T.L. Gleason III, J.E. Smith Jr., I.K. Iskandar et L.E. Sommers. University of California, Riverside.

LONG, C.M., M.J. VIROLLE, S.Y. CHANG, S. CHANG et M.J. BIBB. 1987.  $\alpha$ -Amylase gene of *Streptomyces limosus* : Nucleotide sequence, expression motifs and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate  $\alpha$ -amylases. J. Bacteriol. 169 : 5745-5754.

LORENTZ, M.G. et W. WACKERNAGEL. 1987. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rate of adsorbed DNA. Appl. Environ. Microbiol. 53 : 2948-2952.

LOUWS F.J., D.W. FULBRIGHT, C. TAYLOR STEPHENS et F.J. DeBRUIJN. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 2286-2295.

LOVETT, J. 1987. Listeria isolation. Pp. dans Bacteriological analytical manual, supplément. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Va.

LYNCH, J.M. 1988. The terrestrial environment. Pp. 103-131 dans Micro-organisms in action : Concepts and applications in microbial ecology. Éditeurs : J.M. Lynch et J.E. Hobbie. Blackwell Scientific, Oxford.

MAHBUBANI, M.H., A.K. BEJ, R. MILLER, L. HAFF, J. DICESARE et R.M. ATLAS. 1990a. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Mol. Cell. Probes 4 : 175-187.

MAHBUBANI, M.H., A.K. BEJ, R. MILLER, L. HAFF, J. DICESARE et R.M. ATLAS. 1990b. Detection of bacterial mRNA using PCR. BioTechniques 10 : 48-49.

MAHBUBANI, M.H., A.K. BEJ, M. PERLIN, F.W. SCHAEFER III, W. JAKUBOWSKI et R.M. ATLAS. 1991. Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live and dead cysts. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 3456-3461.

MALY, M.S. et G.W. BARRETT. 1984. Effects of two types of nutrient enrichment on the structure and function of contrasting old-field communities. The American Midland Naturalist 111: 342-357.

MARTENSSON, A.M. et WITTER E. 1990. Influence of various soil amendements on nitrogen-fixing soil microorganisms in a long-term field experiment, with special reference to

sewage sludge. Soil Biol. Biochem. 22 : 977-982.

McBRIDE, M.B. 1995. Toxic metal accumulation from agricultural use of sludge : are USEPA regulations prospective ? J. Environ. Qual. 13 : 60-62.

McGRATH, S.P., P.C. BROOKES et K.E. GILLER. 1988a. Effect of potentially toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens*. Soil Biol. Biochem. 20 : 415-424.

McGRATH, S.P., P.R. HIRSCH et K.E. GILLER. 1988b. Effect of heavy metal contamination on the genetics of nitrogen fixing populations of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Pp. 164-166 dans Proceeding of the international conference of environmental contamination. Éditeurs : A.A. Orio (CEP, Édinbourg), Venise, Italie.

MEHLING, A., U.F. WEHMEIER et W. PIEPERSBERG. 1995. Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA : toward a specific identification system for streptomycetes using PCR. Microbiology 141 : 2139-2147.

MELCHIORRI-SANTOLINI, U. 1972. Enumeration of microbial concentration of dilution series (MPN). Pp. 64-70 dans Technique for the assessment of microbial production and decomposition in fresh waters. Éditeurs : Y.I. Sorokin et H. Kadoda. IBP handbook no. 23. Blackwell scientific publications. Oxford, England.

MENCH, M., C. JUSTE et P. SOLDA. 1992. Effets de l'urbanisation de boues urbaines en essai de longue durée : accumulation des métaux par les végétaux supérieurs. Bull. Soc. Bot. Fr. 139 : 141-156.

MENVIQ. 1990. Rapport sur l'état de l'environnement en 1989, Direction de la promotion du développement durable du Ministère de l'Environnement du Québec, 42 p.

MENVIQ. 1991a. Valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales - Guide des bonnes pratiques. Gouvernement du Québec, Ministère de l'environnement et Ministère des Pêcheries, de l'Agriculture et de l'Alimentation, Québec, 91 p.

MENVIQ. 1991b. Valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales - Guide des bonnes pratiques. Gouvernement du Québec, Ministère de l'environnement, Ministère des forêts et Ministère de la santé et des services sociaux, Québec, 83 p.

MENVIQ. 1992. État de l'environnement au Québec. Gouvernement du Québec, Ministère

de l'Environnement et de la Faune, Montréal, 560 p.

MENVIQ et MINISTÈRE DE LA FAUNE DU QUÉBEC. 1995. Pour une gestion durable et responsable de nos matières résiduelles - Document de consultation publique, Québec, 52 p.

MESQUITA, M.E., J.M. VIEIRA E SILVA et H. DOMINGUES. 1994. Copper adsorption by a schistic soil. Application of sewage sludge. Environ. Tech. 15 : 1089-1094.

METTING, F.B. Jr. 1985. Soil microbiology and biotechnology. Pp. 196-214 dans Biotechnology : Applications and research. Éditeurs : P.A. Cheremisinoff et R.P. Ouellette. Technomic Publishers, Lancaster, Penn.

METTING, F.B. Jr. 1993. Structure and physiological ecology of soil microbial communities. Pp. 3-26 dans Soil microbial ecology. Éditeur : F.B. Metting. M. Dekker Inc., New York, 646 p.

MILLAR, W.N. et L.E. CASIDA, Jr. 1970. Evidence for muramic acid in soil. Can. J. Microbiol. 16 : 299-304.

MILLER, J. et F.C. BOSWELL. 1981. Cadmium, lead and zinc in growing rats fed corn leaf tissue grown on soil amended with sewage sludge or heavy metal salts. Environ. Health Perspectives 42 : 197-202.

MILLER, M.S. et I.L. PEPPER. 1988. Survival of a fast growing strain of lupin rhizobia in Sonoran Desert soils. Soil Biol. Biochem. 20 : 323-327.

MILLS, A.L. et R.R. COLWELL. 1977. Microbiological effects of metal ions in Chesapeake Bay waters and sediments. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 18 : 161-167.

MININNI, G. et M. SANTORI. 1987. Problems and perspectives of sludge utilization in agriculture. Agriculture, Ecosystems and Environment 18 : 291-311.

MORIARTY, D.J.W. 1975. A method for estimating the biomass of bacteria in aquatic sediments and its application in trophic studies. Oecologia (Berlin) 20 : 219-229.

MORIARTY, D.J.W. 1977. Improved method using muramic acid to estimate biomass of bacteria in sediments. Oecologia (Berlin) 26 : 217-223.

MORIARTY, D.J.W. 1978. Estimation of bacterial biomass in water and sediments using muramic acid. Pp. 31-33 dans Microbial ecology. Éditeurs : M.W. Loutit et J.A.R. Miles. Springer-Verlag, Berlin, 452 p.

- MSAKY, J.J. et R. CALVET. 1990. Adsorption behavior of copper and zinc in soils : influence of pH on adsorption characteristics. *Soil Science* 150 : 513-522.
- MULLER-WEGENER, U. 1988. Interaction of humic substances with biota. Pp. 179-192 dans *Humic substances and their role in the environment*. Éditeurs : F.H. Frimmel et R.F. Christman. John Wiley and Sons, Ltd., New York.
- MULLIS, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262 : 56-65.
- MULLIS, K.B. et F. FALOONA. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155 : 335-351.
- MULLIS, K.B., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN et H. EHRLICH. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* : The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 51 : 263-273.
- MUNGER, S. 1983. Forest land of municipal sludge : The risk assessment process. Pp 117-124 dans *The forest alternative for treatment and utilization of municipal and industrial wastes*. Éditeurs : D.W. Cole, C.L. Henry et W.L. Nutter, 582 p.
- NAKAJIMA, R., T. IMANAKA et S. AIBA. 1986. Comparison of amino acid sequences of eleven different  $\alpha$ -amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23 : 355-360.
- NAMBAIR, P.T.C. et V. ANJIAH. 1985. Enumeration of rhizobia by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Appl. Bacteriol.* 58 : 187-193.
- NAVARRO, E., P. SIMONET, P. NORMAND et R. BARDIN. 1992. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Arch. Microbiol.* 157 : 107-115.
- OBBARD, J.P., D.R. SAUERBECK et K.C. JONES. 1993. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in soils amended with heavy metal contaminated sewage sludges. *Soil Biol. Biochem.* 25 : 227-231.
- OEHME, F.W. 1978. Mechanisms of heavy metals inorganic toxicities. Pp. 69-85 dans *Toxicity of heavy metals in the environment, Part 1*. Éditeur : F.W. Oehme, Marcel Dekker inc., New York.
- OGRAM, A., G.S. SAYLER et T. BARKAY. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7 : 57-66.

OHSHIMA, Y. et T. MASUTA. 1991. Sludge melting : Japan's method of treatment. Water Environ. Tech. Juin : 179-182.

PAABO, S., J.A. GIFFORD et A.C. WILSON. 1988. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. Nucl. Acids Res. 16 : 9775-9787.

PAERL, H.W. et N.J. WILLIAMS. 1976. The relation between adenosine triphosphate and microbial biomass in diverse aquatic ecosystems. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie 61 : 659-664.

PAGET, E., L.J. MONROZIER et P. SIMONET. 1992. Adsorption of DNA on clay minerals : protection against DNase I and influence on gene transfer. FEMS Microbiol. Lett. 9 : 31-40.

PAHREN, H.R., J.B. LUCAS, J.A. RYAN et G.K. DOTSON. 1979. Health risks associated with land application of municipal sludge. J. Wat. Poll. Cont. Fed. 51 : 2588-2601.

PARADIS, E., C. GOYER, N.C. HODGE, R. HOGUE, R.E. STALL et C. BEAULIEU. 1994. Fatty acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in eastern Canada. Int. J. Syst. Bacteriol. 44 : 561-564.

PARR, J.F. et S.B. HORNICK. 1993. Utilization of municipal wastes. Pp. 545-560 dans Soil microbial ecology. Éditeur : F.B. Metting. M. Dekker Inc., New York, 646 p.

PARR, J.F., P.B. MARSH et J.M. KLA. 1983. Land treatment of hazardous wastes. Noyes HortScience 15 : 162-166.

PAUL, J.H., L. CAZARES et J. THURMOND. 1990. Amplification of the *rbcL* gene from dissolved and particulate DNA from aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 1963-1966.

PAYMENT, P. 1993. Risques d'exposition des travailleurs à des virus entériques à la suite de l'épandage de boues provenant de stations d'épuration des eaux usées municipales. Université du Québec, Institut Armand-Frappier, Centre de recherche en virologie, pour le Ministère des forêts, Laval, 21 p.

PELCZAR, J., E.C.S. CHAN et N.R. KRIEG. 1986. Microbiology. 5<sup>e</sup> édition. Éditeurs : M.J. Martin, K.M. Civetta et J.W. Bradley. McGraw-Hill, New York, 918 p.

PETRUZZELLI, G. 1989. Recycling wastes in agriculture : heavy metal bioavailability. Agriculture, Ecosystems and Environment 27 : 493-503.

- PETRUZZELLI, G., L. LUBRANO, B.M. PETRONIO, M.C. GENNARO, A. VANNI et A. LIBERATORI. 1994. Soil sorption of heavy metals as influenced by sewage sludge addition. *J. Environ. Sci. Health A29* : 31-50.
- PICARD, C., C. PONSONNET, E. PAGET, X. NESME et P. SIMONET. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 2717-2722.
- PICKETT, A.W. et A.C.R. DEAN. 1976. Cadmium and zinc sensitivity and tolerance in *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes*. *Microbios* 15 : 79-91.
- PICKETT, A.W. et A.C.R. DEAN. 1979. Cadmium and zinc sensitivity and tolerance in *Bacillus subtilis* subsp. *niger* and in a *Pseudomonas* sp. *Microbios* 24 : 51-64.
- PILLAI, S.D., K.L. JOSEPHSON, R.L. BAILEY, C.P. GERBA et I.L. PEPPER. 1991. Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 2283-2286.
- PILLAI, S.D. et I.L. PEPPER. 1990. Survival of *Tn5* mutant bean rhizobia in desert soils : Phenotypic expression of *Tn5* under moisture stress. *Soil Biol. Biochem.* 22 : 265-270.
- PORTEOUS, L.A. et J.L. ARMSTRONG. 1991. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method. *Curr. Microbiol.* 22 : 345-348.
- POSTGATE, J.R. 1969. Viable counts and viability. Pp. 611-628 dans *Methods in microbiology* vol.1. Éditeurs : J.R. Norris et D.W. Ribbons. Academic Press, London.
- POURCHER, A.M., L.A. DEVRIESE, J.F. HERNANDEZ et J.M. DELATTRE. 1991. Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis*, and enterococci as indicators of the origin of fecal pollution of waters. *J. Appl. Bacteriol.* 70 : 525-530.
- ROMANOWSKI, G., M.G. LORENZ, G. SAYLER et W. WACKERNAGEL. 1992. Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 3012-3019.
- ROSZAK, D.B. et R.R. COLWELL. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51 : 365-379.
- SAIKI, R.K. 1989. The design and optimisation of the PCR. Pp. 7 et suivantes dans *PCR technology : Principle and applications for DNA amplification*. Éditeur : H.A. Erlich. Stockton

Press, New York.

SAIKI, R.K. 1990. Amplification of genomic DNA. Pp. 13 et suivantes dans PCR protocols : A guide to methods and applications. Éditeurs : M.A. Innis, D. Gelfand, J.J. Sninsky et T.J. White. Academic Press, San Diego, 482 p.

SAIKI, R.K., D.H. GELFAND, S. STOFFEL, S.J. SCHARF, R. HIGUCHI, G.T. HORN, K.B. MULLIS et H.A. ERLICH. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487-494.

SAIKI, R.K., S. SCHARF, F. FALOONA, K.B. MULLIS, G.T. HORN, H.A. ERLICH et N. ARNHEIM. 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 : 1350-1354.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning : A laboratory manual 2<sup>e</sup> édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

SANCHEZ-MARTIN, M.J. et M. SANCHEZ-CAMAZANO. 1993. Adsorption and mobility of cadmium in natural, uncultivated soils. *J. Environ. Qual.* 22 : 737-742.

SAYLER, G.S. et A.C. LAYTON. 1990. Environmental application of nucleic acid hybridization. *Ann. Rev. Microbiol.* 44 : 625-648.

SCHARF, S.J., G.T. HORN et H.A. ERLICH. 1986. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* 233 : 1076-1078.

SELENSKA, S. et W. KLINGMULLER. 1991. DNA recovery and direct detection of *Tn5* sequences from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 13 : 21-24.

SELENSKA, S. et W. KLINGMULLER. 1992. Direct recovery and molecular analysis of DNA and RNA from soil. *Microb. Releases* 1 : 41-46.

SHARMA, P.D., P.J. FISHER et J. WEBSTER. 1977. Critics of the chitin assay technique for estimation of fungal biomass. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 69 : 479-463.

SHARMA, R.P., J.C. STREET, M.P. VERMA et J.L. SHUPE. 1979. Cadmium uptake from feed and its distribution to food products of livestock. *Environ. Health Perspect.* 28 : 59-66.

SHAW, J.J., F. DANE, D. GIEGER et J.W. KLOEPPER. 1992. Use of bioluminescence for detection of genetically engineered microorganisms released into the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 267-273.



- SHISHIDO, M. et I.L. PEPPER. 1990. Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Biol. Biochem.* 22 : 11-16.
- SHOONER, F. et R.D. TYAGI. 1995. Biolixiviation thermophile des métaux lourds contenus dans les boues d'usine d'épuration des eaux municipales. Conférence présentée au 11<sup>e</sup> congrès de la région de l'est de l'association canadienne sur la qualité de l'eau, 27 octobre 1995.
- SIMONET, P., M.-C. GROSJEAN, A.K. MISRA, S. NAZARET, B. COURNOYER et P. NORMAND. 1991. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 3278-3286.
- SINGER-SAM, J., M.O. ROBINSON, A.R. BELLVÉ, M.I. SIMON et A.D. RIGGS. 1990. Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase, and Kfy gene transcripts during mouse spermatogenesis. *Nucl. Acids Res.* 18 : 1255-1259.
- SMALLA, K., N. CRESSWELL, L.C. MENDONCA-HAGLER, A. WOLTERS et J.D. VAN ELSAS. 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74 : 78-85.
- SMITH, J.L., R.I. PAPENDICK, D.F. BEZDICEK et J.M. LYNCH. 1993. Soil organic matter dynamics and crop residue management. Pp. 65-94 dans *Soil microbial ecology*. Éditeur : F.B. Metting. M. Dekker Inc., New York, 646 p.
- SOMMERS, L.E. 1977. Chemical composition of sewage sludges and analysis of their potential use as fertilizers. *J. Environ. Qual.* 6 : 225-232.
- SOPPER, W.E. 1993. Municipal sludge use in land reclamation. Lewis Publishers, Boca Raton, 163 p.
- STEFFAN, R.J. et R.M. ATLAS. 1988. DNA amplification to enhance the detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 2185-2191.
- STEFFAN, R.J. et R.M. ATLAS. 1991. Polymerase chain reaction : Applications in environmental microbiology. *Ann. Rev. Microbiol.* 45 : 137-161.
- STEFFAN, R.J., J. GOKSOYR, A.K. BEJ et R.M. ATLAS. 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 2908-2915.
- STEVENSON, L.H., T.H. CHRZANOWSKI et C.W. ERKENBRECHER. 1979. The adenosine triphosphate assay : Conception and misconceptions. Pp. 99-116 dans *Native aquatic*

bacteria : Enumeration, activity and ecology. Éditeurs : J.W. Costerton et R.R. Colwell. ASTM Special Technical Publication no. 695. American Society for Testing Materials, Philadelphie.

STOTZKY, G. 1972. Activity, ecology, and population dynamics of microorganisms in soil. CRC Crit. Rev. Microbiol. 2 : 59-137.

STOTZKY, G. et H. BABICH. 1980. Mediation of the toxicity of pollutants to microbes by the physicochemical composition of the recipient environment. Pp 352-354 dans Microbiology. Éditeur : D. Schlessinger. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

STRAIN, S.R., K. LEUNG, T.S. WHITTAM, F.J. DeBRUIJN et P.J. BOTTOMLEY. 1994. Genetic structure of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations found in two Oregon soils under different plant communities. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 2772-2778.

STRAUB, T.M., I.L. PEPPER, M. ABBASZADEGAN et C.P. GERBA. 1994. A method to detect enteroviruses in sewage sludge-amended soil using the PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 1014-1017.

STRAUB, T.M., I.L. PEPPER et C.P. GERBA. 1993. Virus survival in sewage sludge amended desert soil. Wat. Sci. Tech. 27 : 421-424.

STRAUB, T.M., I.L. PEPPER et C.P. GERBA. 1995. Removal of PCR inhibiting substances in sewage sludge amended soil. Wat. Sci. Tech. 31 : 311-315.

SWIFT, M.J. 1973. Estimation of mycelial growth during decomposition of plant litter. Bulletin from the Ecological Research Committee (Stockholm) 17 : 323-328.

TCHOBANOGLIOUS, G. et E.D. SCHROEDER. 1987. Water quality. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, 768 p.

TEBBE, C.C. et W. VAHJEN. 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 2657-2665.

THURMAN, E.M., G.R. AIKEN, M. EWALD, W.R. FISCHER, U. FORSTNER, A.H. HACK, R.F.C. MANTOURA, J.W. PARSONS, R. POCKLINGTON, F.J. STEVENSON, R.S. SWIFT et B. SZPAKOWSKA. 1988. Isolation of soil and aquatic humic substances. Pp. 31-43 dans Humic substances and their role in the environment. Éditeurs : F.H. Frimmel et R.F. Christman. John Wiley and Sons, Ltd., New York.

TORSVIK, V.L. 1980. Isolation of bacterial DNA from soil. Soil Biol. Biochem. 12 : 15-21.

- TORSVIK, V.L. et J. GOKSOYR. 1978. Determination of bacterial DNA in soil. *Soil Biol. Biochem.* 10 : 7-12.
- TORSVIK, V.L., J. GOKSOYR et F.L. DAAE. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 782-787.
- TREVORS, J.T., H. LEE et S. COOK. 1992. Direct extraction of DNA from soil. *Microb. Releases* 1 : 111-115.
- TSAI, Y.-L. et B.H. OLSON. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 1070-1074.
- TSAI, Y.-L. et B.H. OLSON. 1992a. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 754-757.
- TSAI, Y.-L. et B.H. OLSON. 1992b. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 2292-2295.
- TSAI, Y.-L., C.J. PALMER et L.R. SANGERMANO. 1993. Detection of *Escherichia coli* in sewage and sludge by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 353-357.
- TYAGI, R.D., J.F. BLAIS et J.C. AUCLAIR. 1993. Bacterial leaching of metal from sewage sludge by indigenous iron-oxidizing bacteria. *Environ. Poll.* 82 : 9-12.
- TYLER, G. 1975a. Effects of heavy metal pollution and soil enzymatic activity. *Plant Soil* 41: 303-311.
- TYLER, G. 1975b. Heavy metal pollution and mineralization of nitrogen in forest soils. *Nature* 255 : 701-702.
- U.S.ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1989. Standards for disposal of sewage sludge : Proposed rule. *Fed. Reg.* 54 : 5746-5902.
- VANDAL, F. 1995. Analyse avantages-coûts de la valorisation des boues d'usine d'épuration des eaux usées sur les terres agricoles : Cas de Lac-Mégantic. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, 63 p.
- VAN ES, F.B. et L.A. MEYER-REIL. 1982. Biomass and metabolic activity of heterotrophic marine bacteria. *Adv. Microbial Ecol.* 6 : 111-170.

- VASSEUR, L., C. CLOUTIER, A. LABELLE, J.-N. DUFF, C. BEAULIEU et C. ANSSEAU. 1996. Responses of indicator bacteria to forest soil amended with municipal sewage sludge from aerated and non-aerated ponds. *Environmental Pollution* 92 : 67-72.
- VASSEUR, L., P. DE CONNINCK, M. SÉGUIN, J. ST-GERMAIN et C. ANSSEAU. 1994. The STOPER model for ecosystem management at the regional level; a case study on municipal sewage sludge. Cahier 2, STOPER, Université de Sherbrooke, 27 p.
- VERSALOVIC, J., T. KOEUTH et J.R. LUPSKI. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acids Res.* 19 : 6823-6831.
- VIGAL, T., J.A. GIL, A. DAZA, M.D. GARCIA-GONZALEZ et J.F. MARTIN. 1991. Cloning, characterization and expression of an  $\alpha$ -amylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU3570. *Mol. Gen. Genet.* 225 : 278-288.
- VILLENEUVE, C. et N. PONIEWIERA. 1992. Étude de faisabilité de la valorisation agricole complète des boues d'épuration produites par l'usine de Ville de Jonquière. Travail présenté dans le cadre du cours «Ateliers de synthèse» (ERU-12350), Université Laval, Québec, 49 p.
- VOLOSSIOUK, T., E.J. ROBB et R.N. NAZAR. 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 3972-3976.
- VOORDOUW, G., J.D. STRANG et F.R. WILSON. 1989. Organization of the genes encoding [Fe] hydrogenase in *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *oxamicus* Monticello. *J. Bacteriol.* 171 : 3881-3889.
- WANG, A.M., M.V. DOYLE et D.F. MARK. 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86 : 9717-9721.
- WARD, D.M., R. WELLER et M.M. BATESON. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature (London)* 344 : 63-65.
- WATSON, S.W. et J.E. HOBIE. 1979. Measurement of bacterial biomass as lipopolysaccharide. Pp. 82-88 dans *Native aquatic bacteria : Enumeration, activity and ecology*. Éditeurs : J.W. Costerton et R.R. Colwell. ASTM Special Technical Publication no. 695. American Society for Testing Materials, Philadelphie.
- WATSON, S.W., T.J. NOVITSKY, H.L. QUINBY et F.W. VALOIS. 1977. Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 : 940-946.

- WEETMAN, G.F., M.A. McDONALD, C.E. PRESCOTT et J.P. KIMMINS. 1993. Responses of western hemlock, Pacific silver fir, and western red cedar plantations on northern Vancouver Island to applications of sewage sludge and inorganic fertilizer. *Can. J. For. Res.* 23 : 1815-1820.
- WELLER, R. et D.M. WARD. 1989. Selective recovery of 16S rRNA sequences from natural microbial communities in the form of cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 1818-1822.
- WHITE, D.C. 1986. Quantitative physiochemical characterization of bacterial habitats. Pp. 177-203 dans *Bacteria in nature vol.2 : Methods and special applications in bacterial ecology*. Éditeurs : J.S. Pointdester et E.R. Leadbetter. Plenum Press, New York, 385 p.
- WHITE, D.C., R.J. BOBBIE, J.S. HERRON, J.D. KING et S.J. MORRISON. 1979. Biochemical measurement of microbial mass and activity from environmental samples. Pp. 69-81 dans *Native aquatic bacteria : Enumeration, activity and ecology*. Éditeurs : J.W. Costerton et R.R. Colwell. ASTM Special Technical Publication no. 695. American Society for Testing Materials, Philadelphie.
- WILLOUGHBY, L.G. 1978. Methods for studying microorganisms on decaying leaves and wood in fresh water. Pp.31-50 dans *Techniques for the study of mixed populations*. Éditeurs : D.W. Lovelock et r. Davis. Academic Press, London.
- WITTER, E. 1989. Agricultural use of sewage sludge : controlling heavy metal contamination. Nation. Environ. Protect. Board, Solna, Suède.
- WONG, M.H. 1980. Toxic effects of cobalt and zinc to *Chlorella pyrenoidosa* (26) in soft and hard water. *Microbios* 28 : 19-25.
- WOODYARD, D.K. 1986. Risk evaluation for the sludge-borne elements to wildlife food chains. Thèse de doctorat, Michigan State University, 188 p.
- WRIGTH, R.T. 1973. Some difficulties in using <sup>14</sup>C-organic solutes to measure heterotrophic bacterial activity. Pp. 199-217 dans *Estuarine microbial ecology*. Éditeurs : L.H. Stevenson et R.R. Colwell. University of South Carolina Press, Columbia.
- WRIGTH, R.T. 1978. Measurement and significance of specific bacteria of natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 36 : 297-305.
- WRIGHT, F. et M.J. BIBB. 1992. Codon usage in the G + C-rich *Streptomyces* genome. *Gene*. 113 : 55-65.

WRIGTH, R.T. et J.E. HOBBIÉ. 1965. The uptake of organic solutes in lake water. *Limnology and Oceanography* 10 : 23-28.

WRIGTH, R.T. et J.E. HOBBIÉ. 1966. Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ecology* 47 : 447-464.

ZACHAR, V., R.A. THOMAS et A.S. GOUSTIN. 1993. Absolute quantification of a target DNA : a simple competitive PCR for efficient analysis of multiple samples. *Nucl. Acids Res.* 21 : 2017-2018.

ZEVENHUIZEN, L.P.T., J. DOLFING, K.G. KSHUIS et I.J. SHOLTEN-KOERSELMAN. 1979. Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microb. Ecol.* 5 : 139-146.

ZHOU, J., M.A. BRUNS et J.M. TIEDJE. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 316-322.